

ARCHIVES INTERNATIONALES

DE

Pharmacodynamie et de Thérapie

ARCHIVES INTERNATIONALES

DE

Pharmacodynamie et de Thérapie

FONDÉES PAR

E. GLEY, Paris. et J. F. HEYMANS, Gand.

PUBLIÉES PAR

C. HEYMANS, Gand, éditeur.

et

U. G. BIJLSMA, Utrecht.

J. H. BURN, Oxford.

R. HAZARD, Paris.

G. LILJESTRAND, Stockholm.

P. DI MATTEI, Rome.

H. MOLITOR, Rahway.

D. W. RICHARDS, Jr., New York.

E. ROTHLIN, Bâle.

AVEC LA COLLABORATION DE

M. Aiazzi Mancini, Florence; H. H. Anderson, San Francisco; S. Anitchov, Leningrad; E. L. Backman, Upsal; Z. Bacq, Liège; E. Beccari, Ferrara; J. M. Bellido, Toulouse; D. Bennati, Montevideo; J. C. Bock, Copenhagen; J. Bordet, Bruxelles; J. J. Bouckaert, Gand; J. P. Bouckaert, Louvain; D. Bovet, Rome; F. Bremer, Bruxelles; F. Brücke, Vienne; R. Bruynoghe, Louvain; K. Bucher, Bâle; W. Burridge, Oxford; M. Chio, Turin; V. H. Cicardo, Buenos Aires; H. H. Dale, Londres; M. J. Dallemagne, Liège; L. Dautrebande, Liège; S. E. de Jongh, Leiden; A. de Waart, Leiden; J. M. Dille, Seattle; R. Domenjoz, Bâle; V. Erspamer, Bari; U. S. v. Euler, Stockholm; G. K. W. Ferguson, Toronto; E. Fourneau, Paris; H. Fredericq, Liège; Ed. Frommel, Genève; J. H. Gaarenstroom, Groningen; E. M. K. Geiling, Chicago; E. Gellhorn, Minneapolis; J. Giroux, Montpellier; P. Gley, Paris; L. S. Goodman, Salt Lake City; T. Gordonoff, Berne; A. Grevenstuk, Batavia; J. A. Gunn, Oxford; B. N. Halpern, Paris; B. N. P. J. Hanzlick, San Francisco; H. Hermann, Lyon; W. Heubner, Berlin; W. R. Hess, Zurich; J. P. Hoet, Louvain; B. A. Houssay, Buenos Aires; B. Issekutz, Budapest; A. Jarisch, Innsbruck; G. Joachimoglu, Athènes; L. N. Katz, Chicago; A. Knoppers, Amsterdam; Th. Koppányi, Washington; O. Kraye, Boston; J. La Barre, Bruxelles; Chauncey D. Leake, Galveston; O. Loewi, New York; A. Lumière, Lyon; D. I. Macht, Baltimore; G. Mansfeld, Budapest; A. S. Marrazzi, Detroit; L. Massart, Gand; F. Mercier, Marseille; K. O. Möller, Copenhagen; G. Moruzzi, Parma; P. Niccolini, Sienne; P. Nolf, Bruxelles; G. Peeters, Gand; E. Pick, New York; A. Rabbeno, Turin; R. K. Richards, North Chicago; A. F. Richardson, Emory; J. Roskam, Liège; G. B. Roth, Washington; A. Ruysen, Gand; P. Rylant, Bruxelles; M. H. Seevers, Ann Arbor; J. A. Shannon, New-Brunswick; A. Simonart, Louvain; Y. Sollmann, Cleveland; L. C. Soula, Toulouse; M. L. Tainter, New York; C. H. Thienes, Los Angeles; L. Tocco, Palerme; F. G. Valdecasas, Barcelone; H. B. van Dyke, New York; v. Vamossy, Budapest; G. Vinci, Messine; M. Wierzuchowski, Lodz; C. V. Winder, Detroit.

Publiées avec le concours de la Fondation Universitaire de Belgique et du Gouvernement Belge

VOLUME LXXX

(Arch. int. Pharmacodyn.)

SECRÉTARIAT DE LA RÉDACTION

3, Albert Baertsoenkaai

GAND

OFFICE INTERNATIONAL DE LIBRAIRIE

184, Rue de l'Hôtel-des-Monnaies

BRUXELLES

1949

Reprinted with the permission of the Original Publisher

JOHNSON REPRINT CORPORATION
111 Fifth Avenue, New York, N.Y. 10003

JOHNSON REPRINT COMPANY LTD.
Berkeley Square House, London, W.1

First reprinting, 1967, Johnson Reprint Corporation
Printed in the United States of America

FROM THE DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY, UNIVERSITY BUDAPEST
DIRECTOR : DR. B. ISSEKUTZ

THE EFFECT OF ACTEDRON (PHENYLISOPROPYLAMINE) AND THYROXINE ON THE BODY TEMPERATURE

BY

J. SIMONYI AND D. SZENTGYÖRGYI

(Received for publication 15-11-1948).

Several workers have been engaged in examining the influence of thyroxine and the thyroid gland upon the temperature regulation mechanism. PFEIFER (21) and CORI (7) demonstrated, that thyroectomised animals are more susceptible to the effects of cold and temperature regulation improves after administration of thyroxine. GERGELY (8), PFEIFER (21), ASCHER & RUCHTI (2) as well as KORENCHEVSKY (17) maintain, that these animals respond to warmth either less, or to the same extent as normal subjects; other authors have shown just the contrary : PFEIFER (21), BOLDYREFF (4), LIDDEL-SIMPSON (19), CAPITOLO (6), BERDE (3). According to BROCHARDS experiments (5) thyreoectomised cats show a diminished response to pyrogens (tetrahydronaftilamine, pneumococci). Researches of ADLER (1), THAUER (22), MANSFELD (20), KREHL & ISENSCHMIDT (18) also showed the work of the thyroid gland in the heat regulation. GLAUBACH & PICK (9) examined the effect of thyroxine upon changes of heat regulation when disturbed by pyrogens and antipyretics. They found, that tetrahydronaftilamine and cocaine following the administration of thyroxine caused hyperpyrexia, which in turn, could be warded off by employing Na-phenylethyl-barb. Thyroxine checked the Na-phenylethyl-barb. and novocaine effect, but left the influence of chinin and antifebrine unchanged. Thyroxine after cutting the spinal chord had no effect, or only in small degree on the temperature drop caused by novocaine [GLAUBACH & PICK (9), ISSEKUTZ & KÖVÁRI (16), ISSEKUTZ et al. (12), ISSEKUTZ jun. et al. (13)].

In our experiments we employed actedron, a definitively centrally acting pyrogenic agent. [ISSEKUTZ et al. (12), ISSEKUTZ jun. et al. (13)]. We observed the change of the effect of actedron after thyroxine, and the work of various antipyretics upon it as well.

METHODS

For the experiments male albino-rats were used ranging in weight from 80 to 150 grams. In the course of the experiments and also for 4 to 5 days previously the animals were kept on a standard diet. Rats of one and the same group were placed in the same cage. Between temperature measuring and feeding we always kept regular intervals. Body temperature was taken at intervals of 30 and 60 minutes after the administration of the drug to be examined. The thermometer was carefully slid into the rectum, always up to a determined depth and vaseline was employed to avoid harmful effects which might have interfered with the results. The substances under investigation were injected subcutaneously in the form of freshly made solutions. For 100 grams of body weight the following quantities were given: Na-phenylethylbarb. 15 mg (PHEB); urethane 100 mg; amidazophenium 15 mg; antipyrin 15 mg; dihydroergotamine (DHE) 0.8 mg. The effect of thyroxine was investigated with synthetic *d-l* thyroxine of Hofmann La Roche. Every time it was freshly dissolved in 0.1 N. NaOH and was administered after instantaneous neutralisation. For five days doses of 0.5 mg/100 g were given daily. The animals were kept on room temperature, during cooler weather in a 20-24 C° thermostat. The given numbers show that the maximal fall of temperature and rise from the lowest, respectively highest normal. They are the average recordings of the individual groups with S. D.

EXPERIMENTS

At first established a suitable dose of actedron for our experiments. A dose of 2 mg/100 mg caused a fever lasting for 6 to 9 hours with a highest value of 2.1 ± 0.62 C° (10 animals). During it we observed on the animals motorical irritation, increased excitability, biting the cage, but no cramps were seen. Cramps were not even by 4 mg/100 g, neither was there any considerable rise in temperature. Effects of smaller doses could not be adequately evaluated. (FIG. 1),

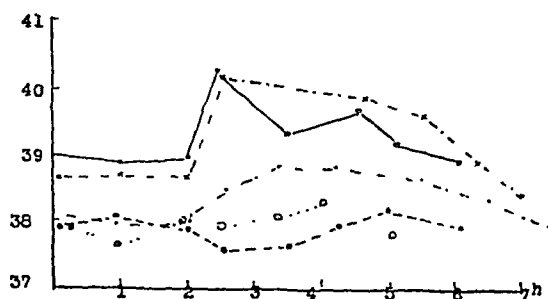


FIG. 1

The effect of various doses of Actedron on the body temperature.

— : 2 mg/100 g Actedron
 - - - : 4 mg/100 g Actedron

· · · · : 0.6 mg/100 g Actedron
 : 0.3 mg/100 g Actedron
 - · - · : 0.15 mg/100 g Actedron

The next step was to find out, what would happen if the animals were given previously thyroxine for five days. Temperature figures (on the animals) were higher in this case. The difference recorded was 3.5 ± 0.67 (Significant difference : 3). Five of the ten animals died (FIG. 2).

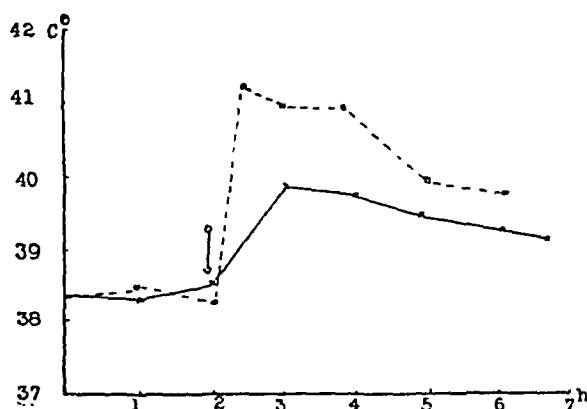


FIG. 2

The effect of Actedron before and after thyroxine administration.

— : 2 mg/100 g Actedron before thyroxine

- - - : 2 mg/100 g Actedron after thyroxine

In order to see whether thyroxine increases the sensitivness of animals to warmth too, we carried out separate experiments. Five animals, that had been kept in room temperature (20-24 C°) were put in a 36 C° thermosthat and their temperature observed. We found that it increased by 1.5 ± 0.13 C°, stayed of that unchanged for two hours, and then fell again, although the animals remained in the thermostat. Animals given thyroxine showed a rise of 3.5 ± 0.67 C°, through heating, a higher figure than that of the controls (FIG. 3).

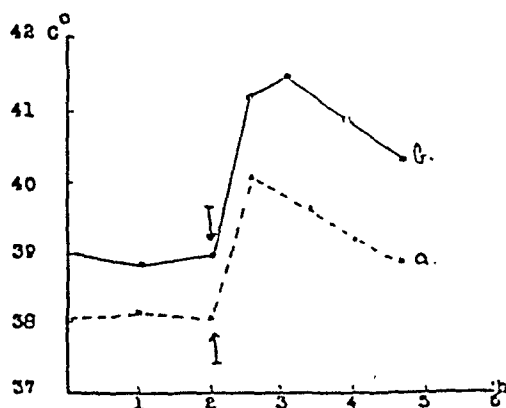


FIG. 3

Animals kept in room temperature

Animals kept in 36.0 C° : | —→

a : control animals; b : animals after thyroxin administration.

Then we examined the antipyretic effect of 15 mg/100 g PhEB. On 16 animals it caused a drop of 2.0 ± 0.3 C°, which stayed with but slight fluctuation for 8 hours. A group of 14 animals, that had received PhEB and actedron at the same time suffered a collapselike drop of temperature. At first we found them under a motional urge, running excitedly to and fro in the cage. After 10 to 20 minutes they were

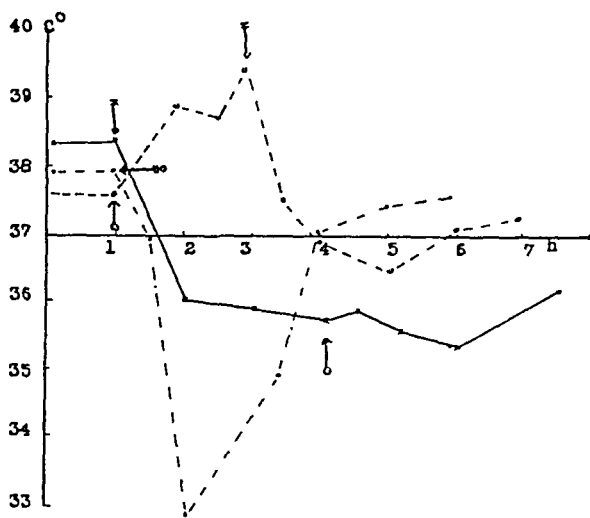


FIG. 4

The effect of PhEB and Actedron on the body temperature

○—→ : 2 mg/100 g Actedron :

||—→ : 15 mg/100 g PhEB

○||—→ : 2 mg/100 g Actedron and 15 mg/100 g PhEB

laying silently in deep narcotism at the bottom of the cage. The condition coincided with a great drop in temperature (5.7 ± 1.2 C°). After 3 hours temperature again increased and the animals recovered.

But when actedron was given first, and PhEB only when the fever had already developed, than PhEB suppressed the fever incited by the actedron. The temperature showed fluctuations about the normal level, and there no collapse appeared. Likewise there was no collapse when waited with the administration of actedron until the antipyretic effect of the PhEB developed. Actedron, in this case, could not raise the temperature up to the normal level (FIG. 4).

After the administration of thyroxine PhEB caused a drop of 1.5 ± 0.4 C° on 5 animals. Actedron suspended the antipyretic effect of PhEB in these animals. Their temperature came to the normal level

within one hour, which was followed by high fever. (2.3 ± 0.5 C°) as high as though actedron had been given without thyroxine administration. (FIG. 5). None of the animals died. Thus the subcortically working PhEB was able to counteract the actedron sensitising effect of throxine.

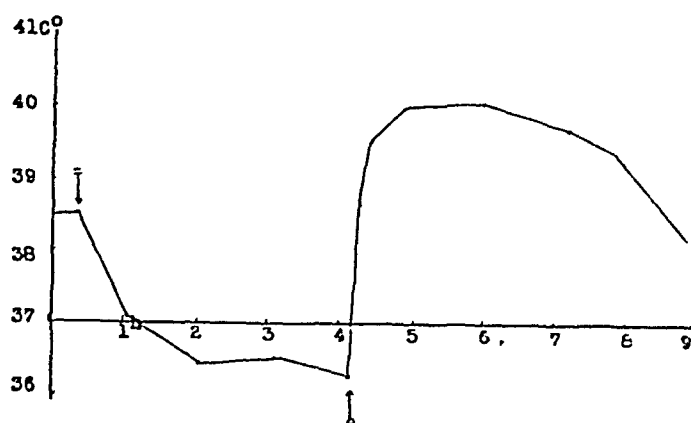


FIG. 5

The effect of PhEB and Actedron after thyroxine administration.

○—→ : 2 mg/100 g Actedron

||—→ : 15 mg/100 g PhEB

Urethane (100 mg/100 g) caused a drop 1.05 ± 0.43 C° on 16 animals. When given together with actedron the same collapse-like drop (4.3 ± 0.9 C°) appeared, a much bigger drop than urethane caused alone. (FIG. 6).

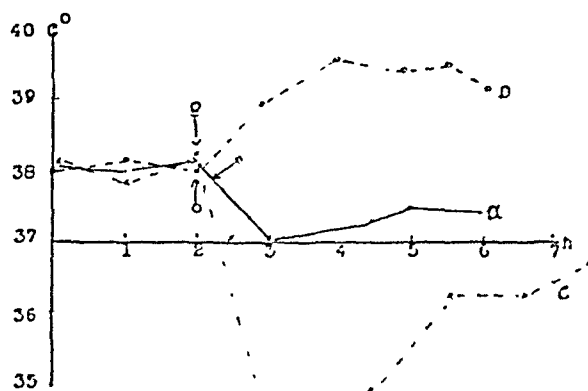


FIG. 6

The effect of Urethane and Actedron on the body temperature.

|—→ : 100 mg/100 g Urethane (a)

○—→ : 2 mg/100 g Actedron (b)

○—→ : 100 mg/100 g Urethane and 2 mg/100 g Actedron (c).

In five animals after thyroxine administration urethane caused a drop of 1.2 ± 0.36 C°. When animals, that had previously received thyroxine, were given urethane and actedron together, no collapse appeared. None of the animals died. (FIG. 7). The animals developed a temperature of 1.5 ± 0.2 C°.

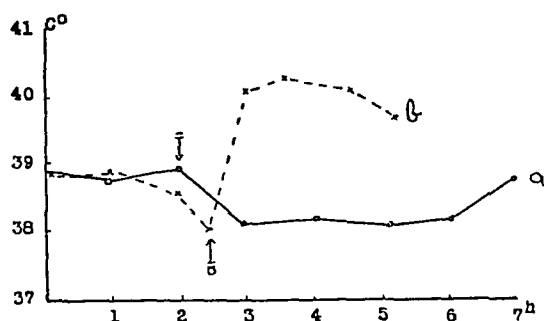


FIG. 7

The effect of Urethane and Actedron on the body temperature after thyroxine administration.

||—→ : 100 mg/100 g Urethane : *a*

o||—→ : 100 mg/100 g Urethane and 2 mg/100 g Actedron : *b*

Novocaine (20 mg/100 g) caused a temperature drop of 1.6 ± 0.7 C° maximum for one hour in 8 animals. When given together with actedron the novocaine effect became compensated and the temperature remained nearly at the normal level as long as the novocaine effect worked. (FIG. 8).

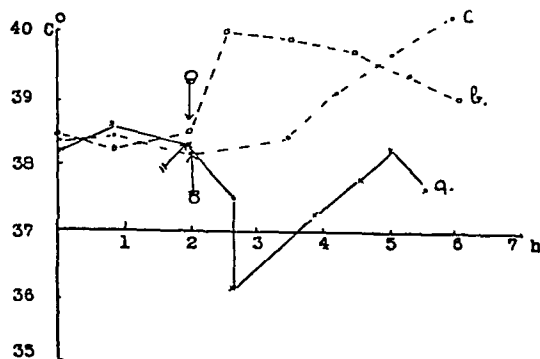


FIG. 8

The effect of Novocaine and Actedron on the body temperature.

||—→ : 20 mg/100 g Novocaine : *a*.

o—→ : 2 mg/100 g Actedron : *b*.

o||—→ : 20 mg/100 g Novocaine and 2 mg/100 g Actedron : *c*.

Likewise a compensatory influence on the novocaine effect was noticed after thyroxine administration. These animals were given novocain and actedron after thyroxine, which resulted in hyperpyrexia of 3.5 ± 0.9 C° maximum value and 3 of the 6 animals died (FIG. 9).

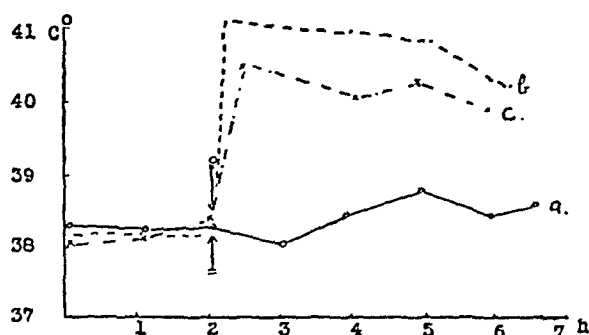


FIG. 9

The effect of novocain and Actedron on the body temperature after thyroxine administration.

||—→ : 20 mg/100 g Novocaine : *a*

o||—→ : 2 mg/100 g Actedron : *b*

o||—→ : 20 mg/100 g Novocaine and 2 mg/100 g Actedron : *c*

Antipyrin (15 mg/100 g) caused a drop of temperature of 1.5 ± 0.3 C° on 3 animals. When given actedron, the compensatory effect brought about a mild fever (1.4 ± 0.2 C°) (FIG. 10).

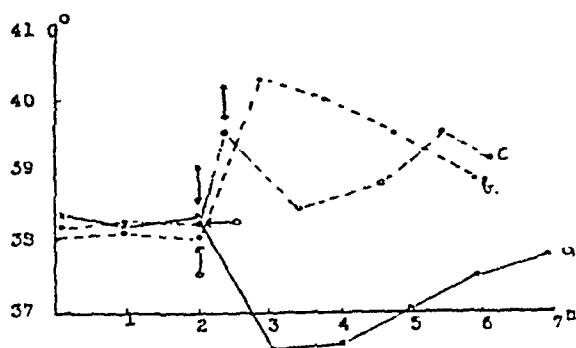


FIG. 10

The effect of Antipyrin and Actedron on the body temperature.

||—→ : 15 mg/100 g Antipyrin : *a*

o||—→ : 2 mg/100 g Actedron : *b*

(||—→) : 2 mg/100 g Actedron and 15 mg/100 g Antipyrin : *c*

Administration of thyroxine, like novocaine, counteracted the effect of antipyrin and temperature showed a slight fluctuation near the normal level. When the same animals were given actedron and antipyrin together, they developed a temperature of 4.0 ± 0.4 C° and two of the three animals died (FIG. 11).

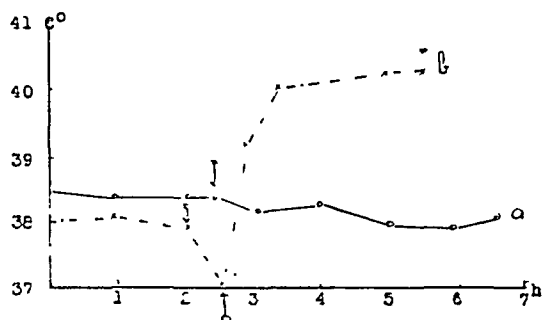


FIG. 11

The effect of Antipyrin and Actedron on the body temperature after thyroxine administration.

||—→ : 15 mg/100 g Antipyrin : a

(||—→) : 15 mg/100 g Antipyrin and 2 mg/100 g Actedron : b.

Amidazophenum (15 mg/100 g) brought about a fall of 4.0 ± 1.0 C° in 8 animals. When administered together with actedron a compensatory influence was achieved against the antipyretic effect. The temperature successively went back to the normal level within half the time (2 hours) (FIG. 12).

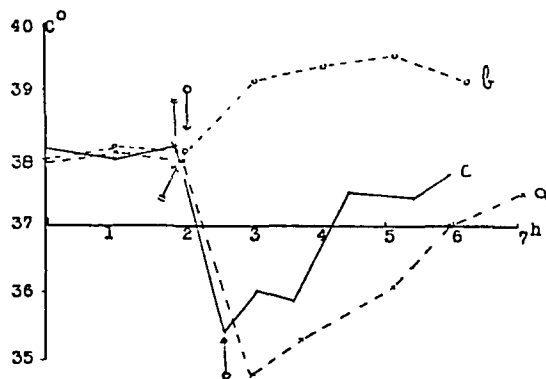


FIG. 12

The effect of Amidazophenum and Actedron on the body temperature.

||—→ : Amid. : a (15 mg/100 g)

o—→ : Act. : b (2 mg)

(||—→) : Amid. and Act. : c.

After thyroxine amidazophenum caused a fall of the temperature of $3.0 \pm 0.42^\circ \text{C}$ in 4 animals. Actedron and amidazophenum given together to the same animals, fever could be observed, but none of the animals died (8 animals, $0.9 \pm 0.12^\circ \text{C}$) (FIG. 13).

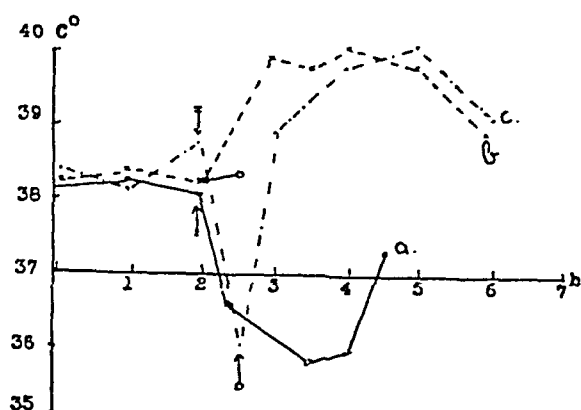


FIG. 13

The effect of Amidazophen and Actedron on the body temperature.

- $\parallel \longrightarrow$: Amidazophenum (15 mg/100 g) : a
 $\circ \longrightarrow$: Actedron (2 mg/100 g) : b
 $(\parallel \longrightarrow \circ \longrightarrow)$: Amidazophenum and Actedron : c.

Dihydroergotamine (0.8 mg/100 g) reduced the temperature by $0.5 \pm 0.2^\circ \text{C}$ in 8 animals. By the time it was eliminated DHE compensated the pyrogenic effect of actedron (FIG. 14).

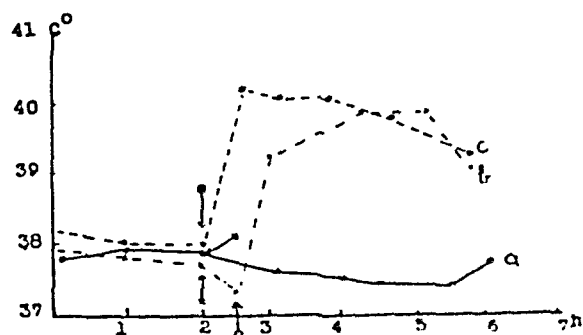


FIG. 14

The effect of DHE and Actedron on the body temperature.

- $\parallel \longrightarrow$: 0.8 mg/100 g DHE : a
 $(\parallel \longrightarrow \circ \longrightarrow)$: 0.8 mg/100 g DHE and 2 mg/100 g Actedron : b
 $\circ \longrightarrow$: 2 mg/100 g Actedron : c.

In animals, that received thyroxine, DHE didn't cause a fall of temperature. The very same animals, however, when given actedron and DHE together, developed high fever (2.0 ± 0.6). (Out of three animals one remained alive.) DHE was not able to prevent the actedron fever in animals that were sensitized by means of thyroxine, although it compensated the actedron effect alone. Similar result was achieved with the metabolism of the animals by ISSEKUTZ & GYERMEK (14) (FIG. 15).

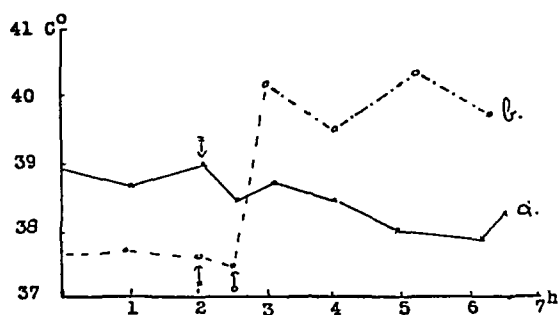


FIG. 15

The effect of Dihydroergotamine and Actedron on the body temperature after thyroxine administration.

||—→ : 0.8 mg/100 g DHE : a

(||—→) : 0.8 mg/100 g DHE and 2 mg/100 g Actedron : b.

DISCUSSION

1) After administration of thyroxine, actedron raises the temperature by 3.5°C , 1.4°C more than without thyroxine.

Numerous investigation have shown, that thyroxine increases the rate of metabolism, besides its peripheral effect, by effecting the subcortical centers. When these centers are either removed by operation, or deeply narcotised, thyroxine has only a slight effect, or none (ISSEKUTZ and coworkers, 12).

Thyroxine makes the subcortical centers more sensitive to sympatic and pyrogenic effects. GLAUBACH & PICK demonstrated that thyroxine treated animals with higher fever to the pyrogenic effect of tetrahydro-naftilamine and cocaine, than under usual conditions (9). Likewise *p*-metitetracor will sooner bring about cramps after thyroxine, than without.

According to our investigations thyroxine has a sensitising effect on the heatcenter against the pyrogenic influence of actedron. The same

phenomen was found by ISSEKUTZ and GYERMEK (14) in connection with metabolism.

Thyroidectomised animals react less to pyrogenic substances. BROCHARD (5), PFEIFER (21), CORI (7), demonstrated, that thyroidectomised animals are more sensitive against cooling and their ability for normal response may be brought back by means of thyroxinising (GERGELY, 8).

Animals which had their thyroid gland removed, or received thiouracil are less sensitive to heat (PFEIFER, 21, ASCHER & RUCHTI, 23, KOREN-CHEVSKY, 17, HERR & PÓRSZÁSZ, 11).

Others (BOLDYREFF, 4, LIDDEL-SIMPSON, 19, CAPITOLO, 6, BERDE, 3) found the contrary. BERDE was not able to restore the defensive ability of the animals against heat, that he has found impaired after thyroidectomy, by means of thyroxine. On the contrary, the animals became even more sensitive to warmth.

In our experiments thyroxine made the animals more sensitive to warmth and thyroxinised animals showed higher temperatures, than those without it.

The fact that some authors, among others HERR & PÓRSZÁSZ in our institute could not confirm, that thyroidectomy increases the sensitiveness to heat, and other hand that thyroxine raises the sensitiveness of the animals—as found BERDE too—does not agree with MANSFELDS thermothirine theory (20). (He assumes, that thermothirine is a hormon of the thyroid gland, that protects the animals against high temperature.)

This part of our experiments serves a further proof of the fact, that thyroxine sensitises the heat center against pyrogenic and thermal effects.

2) Thyroxine treated animals actedron brings about hyperpyrexia, fatal in 50 % of the cases.

Phenylethylbarb., urethane, and amidazophenem save the animals from death, and press down the fever. The temperature level is the same as after actedron alone, without thyroxine treatment.

GLAUBACH & PICK (9) came to similar results: PhEB narcotism, in thyroxine treated animals suppressed the hyperpyrexia induced by tetrahydronaftilamine or cocaine.

PhEB inhibits the sensitising effect of thyroxine by paralysing the subcortical centers.

Urethane narcotism in metabolism experiments affects neither the thyroxine attack, nor the influence of thyroxine-sensitised actedron ISSEKUTZ & HARANGOZÓ-OROSZI, (15), ISSEKUTZ & GYERMEK, (14). It is well known, that urethane primarily attacks the cortex and not the subcortical regions. We assume, that it suppressed thyroxine-actedron

hyperpyrexia by widening the blood vessels of the skin, which, in turn, enhanced the dissipation of heat HANDOWSKY, (10).

Amidazophenium intensifies heat dissipation by depressing the excitability of the heat center, thus giving protection to the animals.

Antipyrin, Dihydroergotamine and novocaine, can not prevent high fever and consequently the animals die. The antipyretic effect of all these medicaments will be compensated by thyroxine alone, and this is why these drugs cannot prevent the actedron sensitising effect of thyroxine. Antipyrin in a quantity of 15 mg/100 g is a much less effective antipyretic, as amidazophenium in a same amount. This accounts for the different effect, although the mechanism of their attack is similar.

3) Administration of thyroxine does not influence the antipyretic effect of urethane, slightly hinders that of PhEB and amidazophenium, but hampers the work of novocaine, DHE and antipyrin. GLAUBACH and PICK (9) found on rabbits and guinea pigs that thyroxine treatment will suppress the antipyretic effect of PhEB by 4.0 C°. Our experiment were carried out on rats. In all probability, this is why thyroxine had so little influence on the antipyretic effect of PhEB (0.5 C°).

The novocaine inhibiting effect of thyroxine has already been described by GLAUBACH and PICK (9) and by ISSEKUTZ & KÖVÁRY (10). As this inhibition did not appear after cutting through the spinal chord, it was concluded that thyroxine acts centrally. Inhibition of DHE effect was dealt with by ISSEKUTZ & GYERMEK (14) in their metabolism investigations.

As shown, thyroxine decreases the sensitiveness of the heatcenter against antipyretics. The different behaviour of urethane is accounted for by the fact that it attacks not the subcortical regions, but the cortex and the epidermic capillars. GERGELY (8) found a similar influence of thyroxine upon the heat center against cold effects.

SUMMARY

1) Thyroxine treatment has a sensitising influence upon the heat center against the pyrogenic effect of actedron and heating. In thyroxine-actedron hyperpyrexia 50 % of the animals die.

2) In thyroxinised animals urethane, amidazophenium, PhEB lessen the lethal effect and hyperpyrexia induced by actedron; whereas DHE, antipyrin and novocaine fail to do so.

3) Administration of thyroxine prevents the antipyretic effect of novocaine, antipyrin and DHE; and lessens that of PhEB and amidazophenum. The attack of urethane remains unaffected by thyroxine.

4) Novocaine, DHE, amidazophenum and antipyrin hinder the effect of actedron.

5) If actedron and PhEB, or actedron and urethane given together cause a collapse like drop of temperature. If one of the drugs is administered only when the effect of the other one has already developed, the collapse will not appear and the PhEB effect will be dominant.

6) Our experiments give a renewed proof of the central effect of thyroxine. It has been found that thyroxine sensitizes the heat center against pyrogenic substances and against warmth, while decreasing its sensitiveness against antipyretics. These results are not in accordance with MANSFELD's themothirine theory.

REFERENCES

1. — ADLER, L. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1920, 87, 406.
2. — ASHER and RUCHTI. *Bioch. Zschrt.*, 1923, 105, 1.
3. — BERDE, B. *Zeitschr. f. Vit., Horm. und Ferm. F.*, 1947, 1, 3-4 h;
Acta Phys. Hung., 1948, 1, 52.
4. — BOLDYREFF, W. N. *Pflügers Arch.*, 1913, 154, 470.
5. — BROCHARD, W. *Klin. Wschr.*, 1928, 2, 1507.
6. — CAPITOLO, J. *Arch. Scienc. Med.*, 1896, 62, 56.
7. — CORI, G. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1922, 95, 328.
8. — GERGELY, J. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1943, 202, 597.
9. — GLAUBACH, S. & PICK, E. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1930.
151, 341; 1931, 162, 537, 551; 1935, 179, 678.
10. — HANDOVSKY, H. *Zschr. Klin. Med.*, 1925, 102.
11. — HERR, F. & PÓRSZÁSZ, J. In press.
12. — ISSEKUTZ, B. et al. *Arch. exp. Path. u. Pharm.*, 1935, 177, 435.
442; 1937, 185, 672; 1942, 199, 292.
13. — ISSEKUTZ, jun. B. et al. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1948.
205, 399, 406, 415.
14. — ISSEKUTZ, B. & GYERMEK, L. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1949, 78.
174.
15. — ISSEKUTZ, B. & HARANGOZÓ-OROSZY. *Arch. f. exp. Path. u.
Pharmacol.*, 1943, 201, 346.

16. — ISSEKUTZ, B. & KÖVÁRI, F. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1942, 200, 156.
17. — KORENCHEVSKY. *Journ. of Path.*, 1926, 29, 401.
18. — KREHL, L. & ISENSCHMIDT, R. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1912, 70, 109; 1914, 75, 10; 1920, 85, 271.
19. — LIDDEL, S. H. & SIMPSON, E. D. *Amer. J. of. Physiol.*, 1925, 72, 76.
20. — MANSFELD, G. *Die Hormonen d. Schilddrüse*. Schwalbe, Basel 1934.
21. — PFEIFER, H. *Arch. f. Path. u. Pharm.*, 1923, 98, 406.
22. — THAUER, R. *Erg. d. Physiol.*, 1939, 41, 607.

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE JASSY, ROUMANIE. DIRECTEUR : PROF. DR. D. BRĂNIȘTEANU

SUR L'ACTION DE L'ACIDE
PHÉNYL-ÉTHYLE-BARBITURIQUE (LUMINAL) SUR LE
CŒUR DE GRENOUILLE PERFUSÉ (IN SITU ET ISOLÉ)

PAR

D. BRĂNIȘTEANU ET GH. GH. POPOVICI

(Travail reçu le 28-1-1949).

L'expérimentation par une technique plus sensible permet de mettre en évidence pour une substance donnée de nouvelles actions. Ainsi, en ce qui concerne l'action des sulfamides sur le cœur de grenouille, la plupart des chercheurs n'en décrivent qu'une action dépressive. Presque tous perfusent le cœur isolé. Quant à nous, en employant comparative-ment et cette technique et une autre plus sensible, nous avons trouvé que le Cibazol à côté de son action dépressive, possède aussi, en doses faibles, une action excitante (1). L'autre technique utilisée par nous a consisté dans la détermination du débit cardiaque, par irrigation du cœur in situ, technique décrite par BÜLBRING (2).

En partant de ces données, nous nous sommes proposés de chercher s'il n'était pas possible de trouver une action excitante pour d'autres substances, auxquelles jusqu'à présent on n'attribuait qu'une action dépressive. Ainsi les hypnotiques, d'après ces données, ne possèdent sur le cœur, qu'une action dépressive. Pour l'acide phényl-éthyle-barbiturique (luminal), hypnotique fréquemment employé, seule cette action se trouve décrite.

IMPENS (3) irriguant le cœur isolé de grenouille avec une solution de Luminal à 0,05 %, MEZEY et STAUB (4) dans leurs recherches sur l'excitabilité électrique de tranches de myocarde détachées du ventricule du cœur de grenouille, soumis à l'action du Luminal, JOHNSTON (5) sur le cœur isolé de la tortue, KUNZOVÁ (6) sur le cœur isolé de grenouille, ont obtenu le même résultat.

Dans ce qui suit, nous avons étudié, comparativement l'action du sel sodique de l'acide phényl-éthyle-barbiturique (Luminal sodique) sur le cœur de grenouille à l'aide des deux techniques suivantes : a) la technique de la détermination du débit cardiaque par irrigation du cœur in situ, et b) la technique de la perfusion du cœur isolé, avec inscription de ses contractions.

a) *Les résultats obtenus par la détermination du débit cardiaque sont résumés dans le présent tableau :*

Concentration du Luminal	Variations du débit cardiaque après emploi du Luminal
0,01 %	Aucune influence.
0,0125 %	Augmente d'abord de 8 % et diminue ensuite de 12 %.
0,015 %	Dans 17 % des cas augmente de 17 % et revient ensuite à la normale; Dans 33 % des cas ne présente aucune modification; Dans 50 % des cas diminue de 20 %.
0,02 %	Dans 33 % des cas augmente de 60 % et descend ensuite de 39 % au dessous de la normale; Dans 67 % des cas diminue de 55 %.
0,025 %	Diminue de 88 %.

Dans le cas, où l'on observe une augmentation du débit, la systole devient plus énergique, le rythme plus fréquent et le tonus s'accroît aussi.

Dans les cas de diminution du débit, le cœur entre dans un état de tonicité de plus en plus réduite, la systole faiblit progressivement et le rythme se ralentit.

Après lavage au Ringer, le débit revient à sa valeur initiale. Au cas où il a été d'abord diminué, le retour est précédé par une phase qui dépasse la valeur normale. Cette période d'hyperexcitabilité apparaît environ 2-6 minutes après le commencement du lavage, se maintient 2-5 minutes, après quoi le débit revient à la normale. Par lavage au Ringer, toutes les fonctions cardiaques amoindries par le Luminal se rétablissent.

b) *Les résultats des recherches obtenus par la technique de l'irrigation du cœur isolé.*

Par l'emploi des mêmes concentrations, on n'observe dans tous les cas qu'une diminution de l'amplitude de la contraction cardiaque. Cet

abaissement va parallèlement à la concentration du Luminal. Avec aucune dose on n'a pu observer de phase d'augmentation de la contraction cardiaque. Par lavage au Ringer, l'amplitude de la contraction revient à la normale, sans plus passer une phase d'hyperexcitabilité, ce qui a lieu en utilisant la technique précédente.

De toutes ces données il ressort, en premier lieu, que les résultats obtenus par la technique de la perfusion du cœur isolé, concordent en tout avec ceux des autres chercheurs, qui tous ont trouvé que les hypnotiques et par conséquent le Luminal aussi, produisent sur le cœur un état dépressif.

Mais, si nous examinons les résultats obtenus par nous par la technique de la détermination du débit cardiaque, technique de beaucoup plus sensible, nous constatons que toutes les doses de Luminal ne possèdent pas une action dépressive. Il existe une certaine dose, faible, qui excite d'abord, ne devient dépressive qu'ensuite. Cette dose excitante est en fonction de chaque cœur.

Examinant de plus près les résultats obtenus par la technique de la détermination du débit cardiaque, nous remarquons que les concentrations dépassant le taux de 0,025 %, sont toujours, dès le début, dépressives. Quant aux concentrations moindres, on ne saurait dire avec précision, quelles serait pour un animal considéré la dose dépressive, quelle serait la dose excitante et quelle serait enfin celle indifférente. Cela tient à ce qu'une dose, dont la concentration se trouve être inférieure à 0,025 %, peut être en même temps dépressive pour un cœur, indifférente ou même excitante pour d'autres. La dose excitante, donc, est en fonction de chaque cœur.

Qu'une dose excitante existe toujours, même dans les cas où par irrigation au Luminal nous n'avons pu l'obtenir, le fait suivant le prouve. Par lavage au Ringer des cœurs rendus hypodynamiques par action du Luminal, le retour à la normale du débit cardiaque est toujours précédé d'une phase d'augmentation. Cette phase d'augmentation du débit pourrait être interprétée comme suit : le lavage au Ringer écartant l'excès de Luminal (excès auquel la dépression cardiaque est due), il ne resterait à un moment donné fixée au myocarde, que la dose excitante. Poussant plus loin le lavage, la dose excitante est aussi enlevée et le débit revient à la normale.

Et au fait que le cœur, par lavage au Ringer, revient très facilement à la normale, nous pouvons encore conclure que les phénomènes produits par le Luminal sur le cœur, sont très probablement dus à un phénomène d'adsorption, fait admis d'ailleurs aussi par ROTH (7) dans ses recherches sur l'action des barbituriques sur le cœur de mammifères.

CONCLUSIONS

Étudiant comparativement l'action du sel sodique de l'acide phényl-éthyle-barbiturique (Luminal sodique) sur le cœur de grenouille, tant par la technique de la détermination du débit cardiaque par irrigation in situ, que par irrigation du cœur isolé, nous avons pu constater que :

1) Le Luminal outre son action cardiaque dépressive, décrite par tous les auteurs, possède, en dose faible, une action excitante d'abord et ensuite seulement dépressive.

2) L'action excitante n'a pu être mise en évidence que par la détermination du débit cardiaque.

3) L'influence du Luminal se manifeste sur les fonctions inotrope, tonotrope et chronotrope.

4) Les modifications produites sont réversibles et serait dues à un phénomène d'adsorption, fait admis aussi par d'autres chercheurs.

BIBLIOGRAPHIE

1. — BRĂNIȘTEANU, D. et POPOVICI, GH. GH. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1949, 80, fasc. 1.
2. — BÜLBRING, E. *Arch. f. exp. Path. und Pharmacol.*, 1930, 152, 257.
3. — IMPENS, E. *Dtsch. med. Wochenschr.*, 1912, 945.
4. — MEZEY, K. und STAUB, H. *Naunyn Schmiedebergs-Archiv*, 1935, 180, 12.
5. — JOHNSTON, R. L. *J. of Pharmacol.*, 1936, 57, 333.
6. — KUNZOVÁ, H. *Čas. Lék. Česk.*, 1941, 782.
7. — ROTH, G. B. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1935, 51, 179.

DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY. UNIVERSITY OF GHENT
DIR. PROF. DR. C. HEYMANS

ON THE PHARMACOLOGY OF TETRAETHYLPYROPHOSPHATE (TEPP)

BY

R. VERBEKE (1)

(Received for publication 14-2-1949).

Tetraethylpyrophosphate (TEPP) is one of the phosphate esters, used in Germany as insecticides. Investigations of its toxicological properties by DEICHMANN and WITHERUP (1) showed that TEPP, absorbed from the alimentary tract or through the skin, induces an acute toxic state characterized by an increase in respiratory movements, hyperexcitability, tremors, convulsions, dyspnea, collapse and death as a result of respiratory failure. The lethal doses of TEPP in rats and rabbits were found to be the half of the corresponding lethal doses of hexaethyl-tetraphosphate (HETP). TEPP is readily absorbed through the skin. When standing in an aqueous solution, it is largely hydrolysed; this hydrolysis results in a decrease of the toxicity of the solution.

The anticholinesterase activity of TEPP was first reported by DUBOIS and MANGUN (2,3) and further studied in detail by BRAUER (4).

KOPPANYI, KARCZMAR and KING (5) investigated the effect of TEPP on sympathetic ganglionic activity; they observed the very marked potentiation of the vasopressor action of acetylcholine in atropinized dogs, previously treated with TEPP.

CHENNELS, DEL CASTILLO, FLOYD, SLOME and WRIGHT (6) examined the action of TEPP on isolated organs in a number of species and on various systems in cats. They stated that TEPP may produce similar effects as HETP, administered in comparable doses.

More recently, HEYMANS, VERBEKE et VOTAVA (7) showed that TEPP may inhibit almost selectively the pseudo-cholinesterase, without

(1) Fellow of the Belgian National Research Foundation.

affecting significantly the true-cholinesterase, and without eliciting cholinergic symptoms. However, selective inactivation of the pseudo-cholinesterase by TEPP sensitized highly the organism towards acetylcholine.

The present experiments were undertaken in order to study further the pharmacological properties of TEPP, mainly in comparison with other anti-cholinesterases: di-isopropylfluorophosphonate (DFP) (8) and HETP (9).

METHODS

The experiments were performed on chloralosed dogs. The blood pressure was recorded manometrically from the femoral artery. The respiration was registered by means of the pneumograph of Marey.

The solution of TEPP ⁽¹⁾ was injected intravenously and sometimes intra-arterially. The water solution of TEPP was freshly prepared immediatly before each experiment.

RESULTS

1. — *Effects of TEPP on blood pressure, heart rate and respiration.*

Intravenous or intra-arterial injection of very small doses of TEPP (0,002-0,05 mg./kg.) produces a marked but transient hypotension, a slight stimulation of respiration, but no change of the heart rate. Sometimes however the hypotension may be associated with a marked tachycardia (FIG. 1).

After administration of 0,05 mg./kg. the heart is already highly sensitized towards acetylcholine (FIG. 2); it is also sensitized—although to a less pronounced degree—towards the electrical stimulation of the peripheral heart vagus (FIG. 3).

Larger doses of TEPP (0,1-0,3 mg./kg.) induce a very marked slowing of the heart, generally appearing 1 to 2 minutes after the injection of the drug and lasting for a long time. Section of the two cervical vagi has no effect on this bradycardia (FIG. 4). The same doses of TEPP elicit a marked bronchial constriction, resulting in asphyxia.

The bradycardia and bronchial constriction are relieved immediatly by the intravenous administration of the synapticolytic substances: tetra-ethyl-ammonium (T.E.A.) (10-20 mg./kg.) and diethylamino-ethyl

(1) Tetraethylpyrophosphate was kindly provided by Tennessee Eastman Corporation.

ester of phenylcyclopentane carboxylic acid (parpanit) (3 mg./kg.) (FIG. 5).

However, the subsequent injection of another dose of TEPP may re-induce a slowing of the heart and bronchial constriction, which can not more be relieved by T.E.A., but are suppressed by atropine and by larger doses of parpanit (5-10 mg./kg.) or diparcol (N-diethylaminoethyl dibenzo-parathiazine hydrochloride) (5-10 mg./kg.) (FIG. 5 and 6).

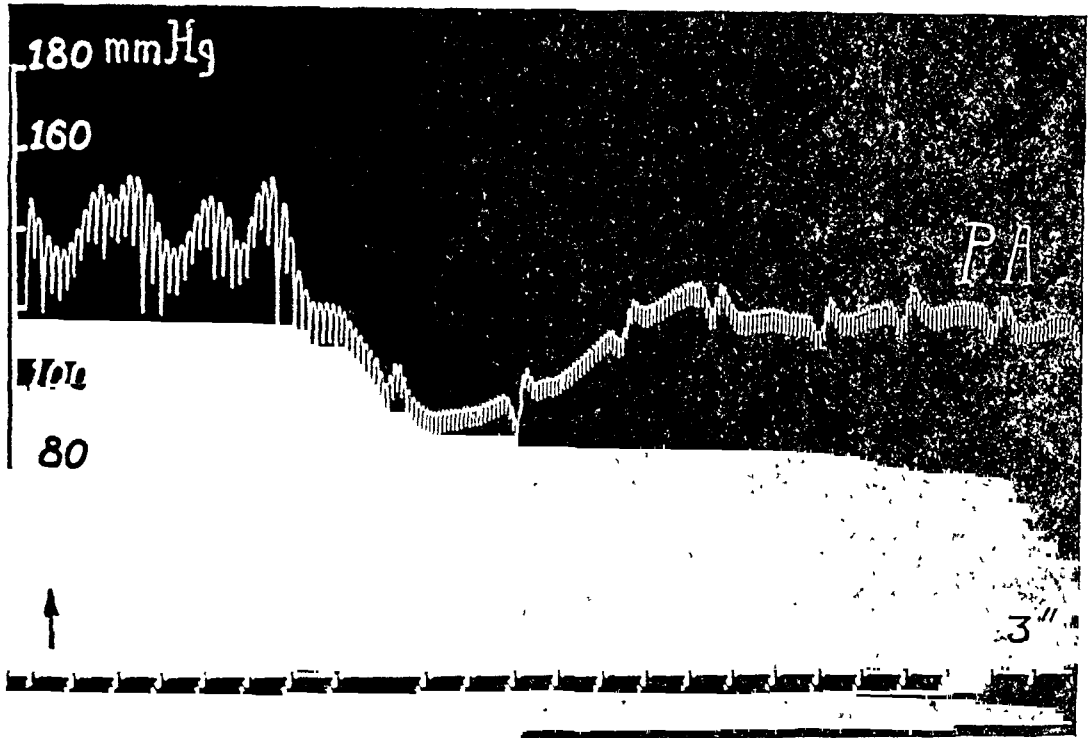


FIG. 1

Dog, 25 kg. Morphine-chloralosane anesthesia.

Vagi intact.

P.A. : systemic arterial blood pressure.

↑ : intravenous injection of 0.04 mg. TEPP/kg. : fall of blood pressure and acceleration of the heart rate.

Hence it appears that the bradycardia and bronchial constriction, caused by TEPP, are due—at the lower dosage range—to the stimulation of the vagal synapses of the heart and the bronchial tree; larger doses of TEPP do stimulate also the peripheral post-synaptic vagal fibers of these organs.

As to the vascular action of TEPP, it must be noted that even after large doses of T.E.A. and parpanit, TEPP still causes a fall of blood pressure. This vasodilatation is probably due to a peripheral vasodilator action.

In atropinized dogs, TEPP reinforces the vasopressor action of acetylcholine. After atropine, TEPP itself never causes hypertension; this means that TEPP does not exert a stimulating effect on the sympathetic vasomotor synapses.

The carotid sinus vasopressor reflex is unaltered after the administration of 0,2-0,3 mg. TEPP/kg.

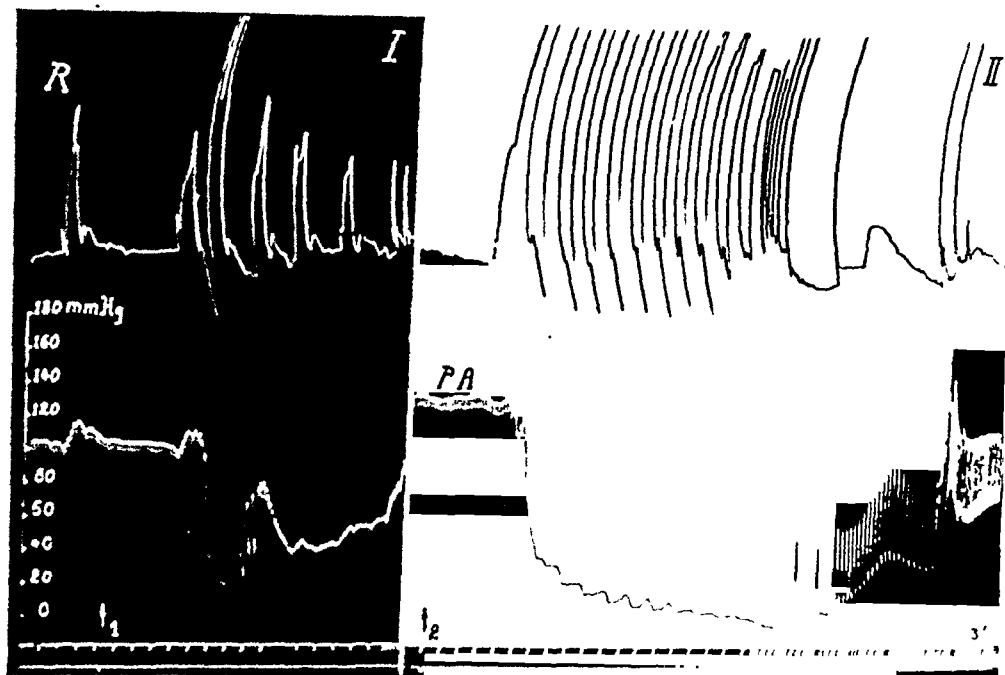


FIG. 2

Dog, 8,5 kg. Morphine-chloralose anesthesia.

Bilateral cervical vagotomy.

R : respiration.

P.A. : systemic arterial blood pressure.

I, \uparrow_1 : intravenous injection of 0,5 mg. acetylcholine into the normal dog.

Between I and II, the animal received a total dose of 0,5 mg. TEPP, injected into the femoral artery. With the exception of muscular fasciculations in the hind limb concerned, no symptoms occurred after this dose of TEPP.

II, \uparrow_2 : intravenous injection of 0,5 mg. acetylcholine : very marked inhibition of the heart and bradycardia lasting for 5 minutes; hyperpnea and convulsions.

2. — *Effect of TEPP on the central nervous system, on the neuromuscular transmission and on the striated muscle.*

Large doses of TEPP (0,5 mg./kg.) produce hyperexcitability and violent convulsions of the nicotinic type. These convulsions disappear after atropine (0,2-1 mg./kg.); they are also suppressed by parpanit or diparcol, but not by T.E.A.

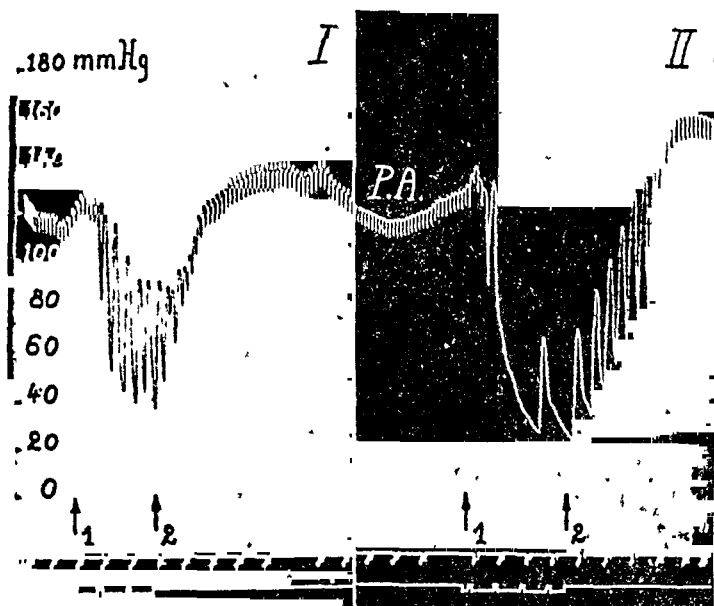


FIG. 3

Dog, 8,5 kg. Morphine-chlorallosane anesthesia.

Bilateral cervical vagotomy.

P.A. : systemic arterial blood pressure.

I, from \uparrow_1 to \uparrow_2 : electrical stimulation of the peripheral end of the heart vagus nerve in the normal dog.

Between I and II, the animal received a total dose of 0,5 mg. TEPP, injected into the femoral artery. With the exception of muscular fasciculations in the hind limb concerned, no symptoms occurred after this dose of TEPP.

II, from \uparrow_1 to \uparrow_2 : electrical stimulation of the peripheral end of the heart vagus nerve (same intensity as in I): the inhibition of the heart is more marked.

It must be noted, however, that after this dose of TEPP, the heart is much more sensitized to acetylcholine than it is to the electrical stimulation of the heart vagus nerve (compare FIG. 2 and FIG. 3).

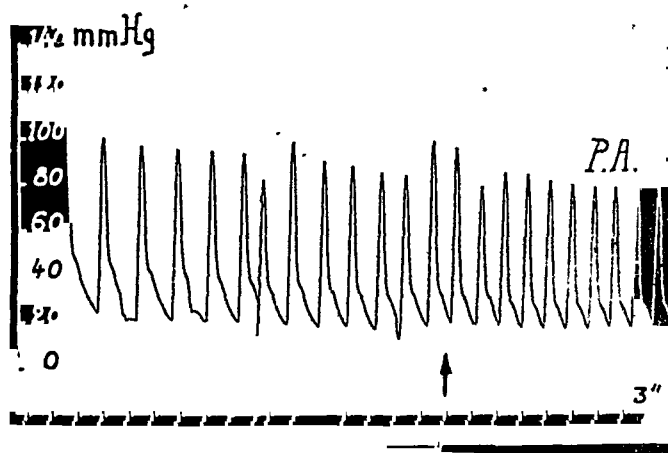


FIG. 4

Dog, 9 kg. Morphine-chlorallosane anesthesia.

Vagi intact.

P.A. : systemic arterial blood pressure.

The figure shows the bradycardia, caused by the intravenous injection of 0,1 mg. TEPP/kg. By cutting both cervical vagi (\uparrow) this bradycardia remains unchanged.

Doses of TEPP up to 1 mg. were injected into the femoral artery of the dogs hind leg in order to examine whether the neuro-muscular transmission would be altered by the drug or not. In these conditions we observed neither potentiation nor depression of the muscular response to electrical stimulation of the sciatic nerve. Nevertheless, very large

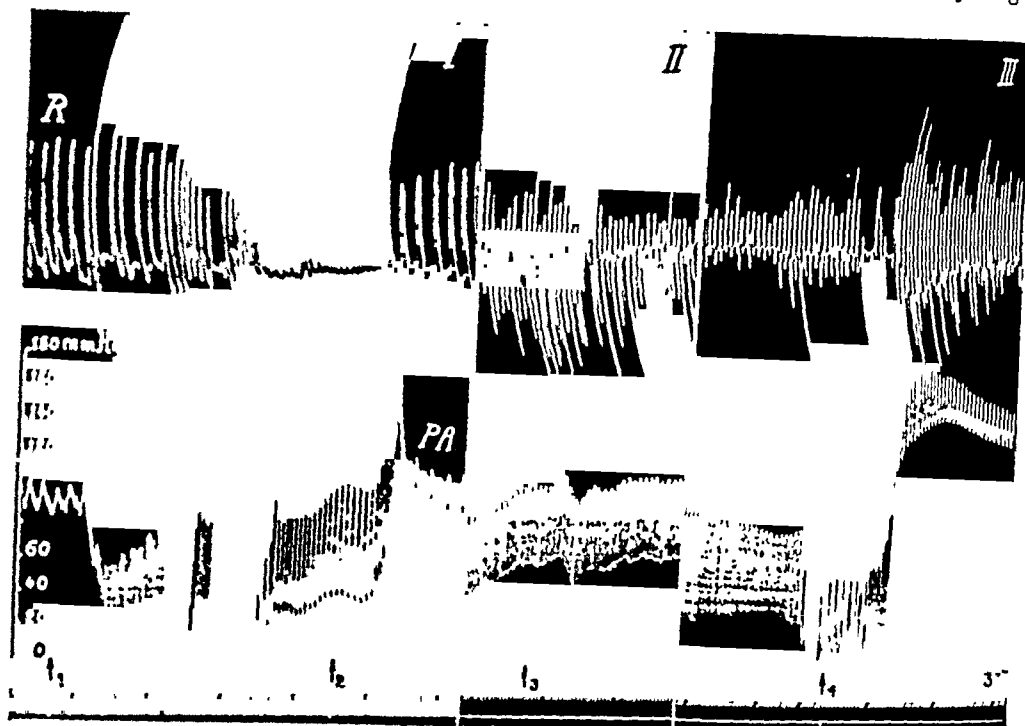


FIG. 5

Dog, 8,5 kg. Morphine-chloralosane anesthesia.

Bilateral cervical vagotomy.

R : respiration.

P.A. : systemic arterial blood pressure.

I, \uparrow_1 : intra-femoral injection of 0,9 mg. TEPP : very marked bradycardia and bronchial constriction.

I, \uparrow_2 : intravenous injection of 12 mg. tetra-ethyl-ammonium/kg. : slowing of the heart and bronchospasm are immediatly relieved.

Between I and II, another dose of 0,05 mg. TEPP/kg. is injected intravenously.

II : after this dose of TEPP, the bradycardia and bronchospasm re-appear.

II, \uparrow_3 : a new dose of 10 mg. tetra-ethyl-ammonium/kg. is injected : the bradycardia and bronchospasm persist.

III, \uparrow_4 : intravenous injection of 2 mg. atropine : respiration is restored and bradycardia disappears.

doses of TEPP (5 mg./kg. and more) depress the neuromuscular transmission and elicit in this way a persistent curarisation.

The intravenous or intra-arterial injection of TEPP induces muscular fasciculations. These fasciculations are suppressed by T.E.A., parpanit or diparcol, but not by atropine.

3. — *Effects of TEPP on other physiological functions.*

TEPP may induce salivation, hyperperistaltism and spasm of the intestine and contraction of the urinary bladder. These symptoms may also be relieved by T.E.A. or, after larger doses of TEPP, by atropine, parpanit or diparcol.

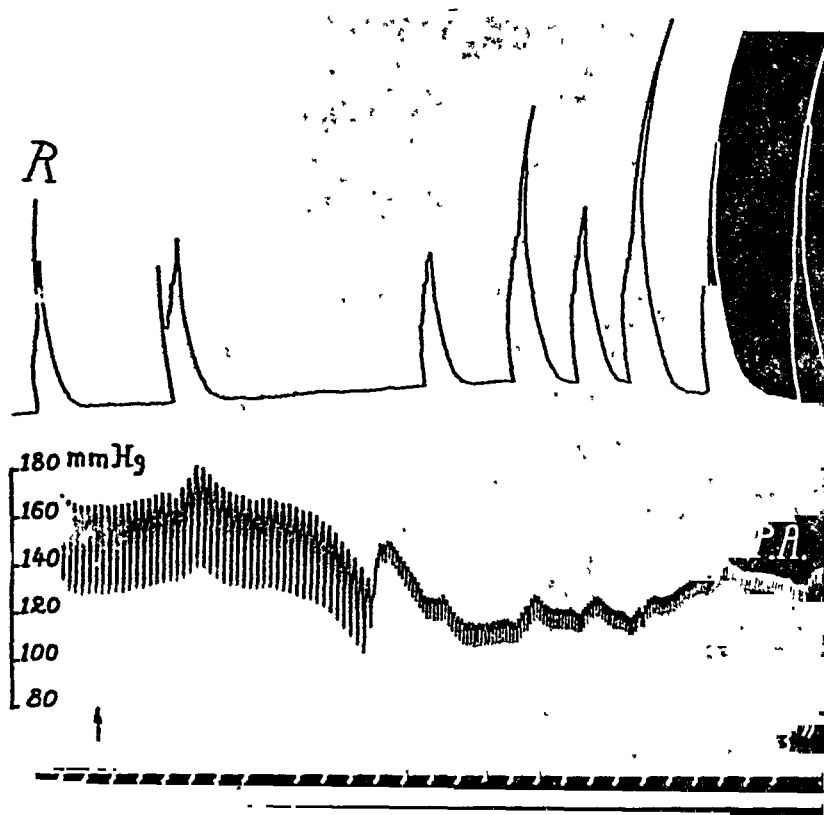


FIG. 6

Dog, 25 kg. Morphine-chloralosane anesthesia.

R : respiration.

P.A. : systemic arterial blood pressure.

The figure shows the bradycardia and depression of respiration, caused by the intravenous injection of 0,12 mg. TEPP/kg.

↑ : intravenous injection of 10 mg. diparcol/kg. : respiration is immediately restored and the bradycardia relieved.

4. — *Protection against acute intoxication by TEPP.*

After atropine and T.E.A., very large doses of TEPP (f. ex. 3 mg./kg.) do not produce any symptom. T.E.A. alone does not protect the animal, while atropine alone induces only partial protection.

Parpanit and diparcol (10-20 mg./kg.) protect completely the dog against large doses of TEPP. In one case we administered, after 20 mg. parpanit/kg., a total dose of 45 mg./kg. TEPP; in another case we injected

after 20 mg. diparcol/kg., 25 mg./kg. TEPP. With the exception of apnea, no symptom occurred in these experiments, performed, of course, under artificial respiration.

SUMMARY

Experiments performed on dogs showed that :

1) Tetraethylpyrophosphate (TEPP) may induce a very marked bradycardia, bronchial constriction, hyperperistaltism and salivation, which are due partly to stimulation of the parasympathetic synapses (small doses of TEPP); this synaptic stimulation is relieved by tetra-ethyl-ammonium (T.E.A.). The bradycardia, bronchospasm, hyperperistaltism and salivation are also due to stimulation of the post-synaptic fibers (large doses); this stimulation is relieved by atropine, parpanit or diparcol.

2) After TEPP, the heart is highly sensitized towards acetylcholine; it is also sensitized—although to a less pronounced degree—towards the electrical stimulation of the peripheral heart vagus.

3) TEPP inactivates selectively the pseudo-cholinesterase. High doses also inhibit the true-cholinesterase.

4) TEPP, even in very small doses, induces a fall of blood pressure, accompanied sometimes by tachycardia. This hypotension is probably due to a peripheral vasodilator action.

5) In atropinized dogs, TEPP reinforces the vasopressor action of acetylcholine. TEPP however does not stimulate directly the sympathetic synapses.

6) TEPP does not influence the carotid sinus vasopressor reflexes.

7) Large doses of TEPP induce convulsions, which are abolished by atropine, parpanit or diparcol, but not by T.E.A.

8) TEPP, in small doses, does not alter the neuro-muscular transmission of excitation in striated muscles. High doses paralyse neuro-muscular junctions.

9) TEPP may induce muscular fasciculations, which are suppressed by T.E.A., parpanit or diparcol.

10) Parpanit, diparcol or the association of atropine and T.E.A. may protect completely the dog against large doses of TEPP.

11) TEPP is primarily a very strong nicotinic compound, which possesses also marked muscarinic properties.

REFERENCES

1. — DEICHMANN, B. and WITHERUP, S. *Fed. Proc.*, 1947, 6, 322.
2. — DU BOIS, K. P. and MANGUN, G. H. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1947, 64, 137.
3. — MANGUN, G. H. *Fed. Proc.*, 1947, 6, 353.
4. — BRAUER, R. *J. Pharmacol.*, 1948, 92, 162.
5. — KOPPANYI, T., KARZMAR, A. G., KING, T. O. *Science*, 1947, 106, 492.
6. — CHENNELS, M., DEL CASTILLO, J., FLOYD, W. F. and WRIGHT, S. *Nature*, 1947, 160, 760.
7. — HEYMANS, C., VERBEKE, R. and VOTAVA, Z. *Arch. intern. pharmacodyn.*, 1948, 77, 486.
8. — HEYMANS, C. and PANNIER, R. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1946, 62, 228.
HEYMANS, C., PANNIER, R. and VERBEKE, R. *Arch. intern. pharmacodyn.*, 1946, 72, 405.
HEYMANS, C. and JACOB, J. *Ibid.*, 1947, 74, 233.
VERBEKE, R. *Ibid.*, 1948, 75, 415.
HEYMANS, C. and CASIER, H. *Ibid.*, 1948, 76, 64.
VERBEKE, R. *Ibid.*, 1949, in press.
9. — VERBEKE, R. and VOTAVA, Z. *Ibid.*, 1949, in press.

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE (PROFESSEUR FRANCISCO G. VALDECASAS)
 ET LABORATOIRE DE DERMATOLOGIE (PROFESSEUR X. VILANOVA).
 FACULTÉ DE MÉDECINE DE BARCELONE

ACTION DU GAMMAHEXANE SUR LES LEVURES D'INTÉRÊT DERMATOLOGIQUE

Hypothèse au Sujet de son Activité Antimétabolique sur l'Inositol

PAR

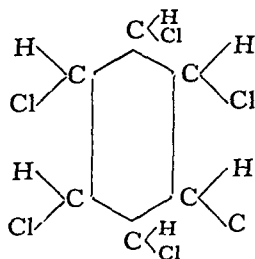
F. G. VALDECASAS, X. VILANOVA, M. CASANOVAS
 ET P. PUIG MUSET

(Travail reçu le 24-1-1949).

Des recherches personnelles antérieures, qui ont déjà fait l'objet de plusieurs publications (1, 2, 3, 4, 5), nous ont permis de constater l'action produite sur certains dermatophytes par diverses substances comme les acides gras, les essences végétales et un bon nombre de leurs composants. Cependant, s'il est vrai que leur action sur des champignons du type T. Gypseum était notable, elle était par contre très faible sur des champignons levuriformes agents pathogènes de lésions cutanées superficielles. L'intérêt évident que présente la découverte d'une substance qui agisse sur cette catégorie de parasites, nous amena à essayer le Gammehexane ou 666, produit qui, comme nous le verrons avait montré une action nocive sur le développement de champignons non pathogènes.

Le γ -hexane est le hexachlorocyclohexane, $C_6H_6Cl_6$ dont la formule structurale est la suivante :

La dénomination de 666, sous laquelle il est connu commercialement, vient de ce que les atomes de chacun de ses composants au nombre de six. Ce corps présente plusieurs formes stéréo-isomères distinctes (selon la position de leurs H et Cl dans l'espace). Actuellement, on connaît les cinq suivantes : α , β , γ , δ et ϵ . Ces isomères ont même une activité toxique qui varie de l'un à l'autre. Ainsi, la dose létale 50 (DL 50) pour le rat serait de 1,25 gramme par Kg. pour le mélange des



isomères, de 1,70 pour α , de 0,19 pour γ et de 1 pour δ . L'isomère β n'est pas toxique. La toxicité élevée sur le rat de l'isomère γ s'observe également quand on le fait agir sur des insectes. De là dérive jusqu'à présent une des principales applications du produit, qui paraît être un insecticide supérieur au dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT) lui-même. Il a donné à ce point de vue de bons résultats en clinique humaine (6) et en médecine vétérinaire dans la lutte contre certains parasites cutanés (gale, pédiculose, etc.) et même dans la lutte antipaludique (7).

Quant à notre conception personnelle, elle est fondée sur les travaux de KIRKWOOD et PHILLIPS, et BUSTON, JACOBS et GOLDSTEIN, qui étudièrent l'action du γ -hexane respectivement sur le *Saccharomyces cerevisiae* et sur le *Nematospora gossypii* (8, 9).

Nos premières recherches eurent pour but de vérifier l'action du Gamme-hexane sur un champignon levuriforme (*Candida* 103 V C). L'expérience fut réalisée de la manière suivante :

Dans quatre tubes, contenant du milieu de Raulin à la saccharose, en répartit des dilutions de γ -hexane en proportion telle que les concentrations finales respectives dans chaque tube fussent de 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000. Étant donné que les dilutions avaient été faites dans l'alcool, on prépara un tube témoin contenant la quantité maxima des substances utilisées dans les tubes expérimentaux.

L'ensemencement fut effectué avec III gouttes d'une suspension de levure (*Candida* 103 V C). Les tubes furent laissés à la température du laboratoire. La lecture au bout de 15 jours montra une inhibition jusqu'à la dilution au 1/2000 inclusivement. Le tube témoin fut +++ au bout de 4 jours. Cette inhibition jusqu'aux dilutions au 1/2000 présentait déjà par elle-même un intérêt considérable, étant donné qu'elle n'avait jamais été obtenue avec aucun des produits essayés antérieurement.

D'autre part, le problème du mécanisme d'action de cette substance se posait. Cette question a provoqué de grandes controverses et présente un intérêt évident du point de vue doctrinal parce qu'elle suggère l'hypothèse que le γ -hexane exerce une action anti-inositol (SLADE, 10), hypothèse qui a été niée par d'autres chercheurs.

Bien que nous considérons que nos recherches ne nous autorisent pas à conclure d'une façon définitive sur ce point, elles n'en sont pas moins intéressantes comme apport expérimental.

Avant de procéder à leur exposition, nous résumerons brièvement l'état actuel de ce problème.

La simple comparaison des formules structurales du γ -hexane et de

l'inositol permet de constater leur ressemblance puisque dans l'inositol il y a simplement une substitution des atomes de Cl par des oxhydriles (OH). Cette analogie fut d'abord signalée et mise en évidence par SLADE. Il émit l'hypothèse selon laquelle le γ -hexane correspondant exactement au méso-inositol par sa structure isomérique, son action pouvait être due à un antagonisme métabolique envers ce factor biotique et vitaminique. L'importance biologique du méso-inositol est parfaitement connue, puisqu'il constitue un facteur vitaminique du groupe B₂, facteur lipotrope et anti-alopécique (11), et qu'il est en outre le facteur Bios I de la croissance de plusieurs types de levures.

Ainsi donc, l'action du γ -hexane sur le méso-inositol se rattacherait à la conception des métabolites et antimétabolites, doctrine qui prit origine dans l'étude des vitamines et antivitamines et fut concrètement développée dans le cas bien connu des sulfamides (12).

Une vérification par des méthodes chimiques de l'hypothèse de SLADE fut tentée par DOCEY, COLUCHY et KIRKWOOD, mais sans résultat. En raison de cet échec, KIRKWOOD, en collaboration avec PHILLIPS (8) essaya la vérification par des méthodes biologiques. Il fit pour cela, des cultures de *Saccharomyces cerevisiae* (Souche Gebrüder MAYER) dans le milieu de WILLIAM exempt d'inositol, et vit que les isomères α et β manquaient pratiquement d'action, que le δ agissait un peu, et que le γ avait une action inhibitrice presque totale sur la croissance. Or, cette action antibiotique du γ -hexane s'inhibait parallèlement à la quantité de méso-inositol que l'on ajoutait au milieu jusqu'à un maximum de 6 microgrammes. L'action des autres isomères ne variait pas par l'addition du méso-inositol. Un tel résultat plaide totalement en faveur de l'hypothèse de SLADE et l'on peut dire la même chose des recherches de BUSTON, JACOBS et GOLDSTEIN (9) qui vérifient cette même action sur un ascomycète, le *Nematospora gossypii*, qui a également besoin de Meso-inositol comme facteur Bios.

Cependant, postérieurement à ces résultats ont paru un grand nombre de travaux utilisant des procédés différents, et dans lesquels l'antagonisme du méso-inositol et du γ -hexane ne se vérifie pas. Parmi les arguments opposés à l'hypothèse de cet antagonisme figurent les suivants : B. DE MEILON (13) administre 50 mgr. de γ -hexane à des lapins de 1700 gr. et observe que les arthropodes qui sucent leur sang meurent. L'injection aux lapins de 10 cc. d'une solution de méso-inositol à 5 % n'évite pas l'intoxication de ces parasites.

R. L. METCALF (14) constate que l'inositol ne diminue pas l'activité du γ -hexane sur les *Heliothrix haemorrhoidalis*. DESDEN et KRIJGSMAN (15) injectent à un insecte, le *Periplaneta americana* des doses égales de

méso-inositol et de γ -hexane et trouvent que la toxicité de ce dernier corps n'est pas diminuée. FROMOGÉOT et CONFINO (16) réalisent des épreuves similaires avec 12 types de bactéries anaérobies et 13 d'aérobies, obtenant les mêmes résultats.

CHOIX et LACROIX (17) font l'essai de la toxicité du γ et du δ -hexachlorocyclohexane sur les œufs fécondés de l'oursin et observent que l'inositol ne diminue point leurs effets. (Dans ce cas il faut signaler que l'isomère δ fut plus actif que le γ .)

De tous ces résultats, aucun ne peut constituer un argument contre l'hypothèse de SLADE, à savoir : que le γ -hexane peut agir comme antimétabolite de l'inositol. En effet, ni pour les germes aérobies ou anaérobies, ni pour les arthropodes, ni pour les œufs d'oursins, il n'a été démontré que l'inositol ne puisse pas être produit par synthèse, par le métabolisme propre de l'organisme en expérience et qu'un apport extérieur continu soit nécessaire. Le cas des œufs d'oursins est bien évident. On a donc confondu le concept d'antimétabolite avec celui d'antidote ou de contrepoison, qui ne correspond en rien à la réalité.

Nous considérons, en conséquence, l'hypothèse de SLADE comme conservant toute sa valeur. Elle a d'ailleurs été confirmée par KIRKWOOD dans le cas concret des levures, seuls organismes pour lesquels il a été démontré que l'inositol est le Bios I.

Notre seconde série d'expériences in vitro sur l'action inhibitrice du γ -hexane sur le développement des levures fut conduite de la manière suivante :

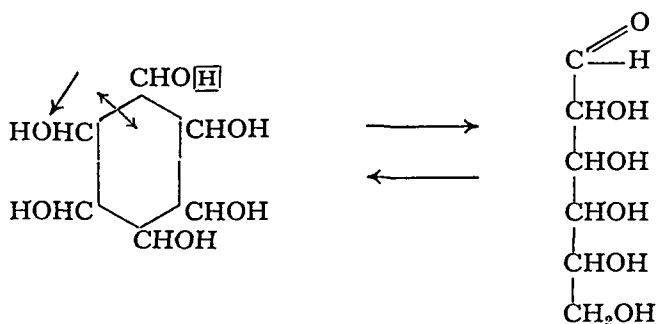
A un milieu nutritif purement constitué de sels minéraux on additionna différents sucres et on chercha à déterminer lequel d'entre eux permettrait un plus grand développement desdits champignons en présence du γ -hexane, supposant en outre que quelques uns d'entre eux seraient plus facilement transformables en inositol et constitueraient une protection contre l'action du composé essayé. La recherche fut effectuée de la façon suivante :

On prépara 5 séries de tubes contenant les éléments minéraux de la solution de RAULIN, auxquelles on ajoute respectivement 5 variétés de sucres. Chaque série fut additionnée de dilutions de γ -hexane en proportion telle que les concentrations finales allaient du 1/500 au 1/32000. Les tubes furentensemencés avec *Candida* 103 VC et laissés à la température du laboratoire. Au bout de 15 jours les résultats furent les suivants :

Milieu de Raulin à la mannite au 2 %	inhibition jusqu'au 1/4000 inclusive
» » l'arabinose au 2 %	» » 1/4000 »
» » le galactose au 2 %	» » 1/2000 »
» » le lévulose au 2 %	» » 1/2000 »
» » le glucose au 2 %	» » 1/2000 »

Chaque série comprenait un tube témoin : la croissance du champignon fut constatée dans chacun d'eux.

La possibilité de transformation de la glucose en inositol et vice-versa est un fait déjà connu. La formule brute de ces corps est la même. L'un est disposé en chaîne fermée (cyclique) et l'autre en chaîne ouverte avec transposition d'un H suivant le schéma ci-dessous :



On a vérifié cette transformation chez l'animal par l'emploi des isotopes c'est-à-dire en incorporant du deutérium à la molécule de l'inositol et en le détectant ensuite dans la glucose (STETTEN et DE WITT, 18). NEEDHAM (19) démontra qu'en injectant de la glucose à des œufs de poule incubés, on y trouvait plus tard une augmentation considérable du méso-inositol. Par conséquent, il est possible aux levures d'élaborer autant d'inositol qu'il leur est nécessaire à partir de la glucose du milieu de culture. C'est en nous fondant sur ce fait que nous fîmes les cultures citées antérieurement. Il suffit que l'hexa-alcool mannite prenne une forme cyclique pour donner un type d'inositol. La levulose peut se transformer aisément en glucose dont elle est épimère. La galactose aussi, quoique moins facilement. L'arabinose ne peut se transformer en glucose, parcequ'elle est une pentose possédant par conséquent un atome de carbone de moins que les hexoses cités d'abord. Les résultats de nos expériences montrent que la lévulose et la galactose donnent le même résultat que le glucose. L'arabinose, qui ne peut pas se transformer en glucose et qui pour cette raison ne peut être une source ultérieure de méso-inositol, donne un résultat plus élevé, c'est-à-dire qu'elle permet au γ -hexane d'agir davantage. La mannite, qui semblerait devoir produire de l'inositol avec le plus de facilité, donne le même résultat que l'arabinose. L'interprétation de ce fait est que la « cyclisation », la transformation cyclique, directe des hexa-alcools aliphatiques, ne doit pas être biochimiquement possible, et d'autre part, l'oxydation de la mannite ne donne pas, comme on sait, directement de la glucose mais de la mannose et de la lévulose.

L'hexa-alcool qui donne de la glucose par oxydation est la sorbose, mais il nous a été momentanément impossible de nous en procurer.

Il faut cependant faire ressortir que les différences entre les divers sucres sont très marquées. Mais cette petite différence est un argument en faveur de ceci : les sucres qui peuvent se transformer en glucose, source possible de méso-inositol, ne permettent qu'une action moindre du γ -hexane.

RÉSUMÉ

Les expériences mettent en évidence le fait suivant : le γ -hexane est efficace contre les levures d'intérêt dermatologique jusqu'à une dilution de 1/2000.

Des essais effectués avec des milieux contenant différents sucres ont démontré que ceux qui peuvent se transformer le plus facilement en glucose diminuent l'activité du γ -hexane.

BIBLIOGRAPHIE

1. — X. VILANOVA, F. G. VALDECASAS, M. CASANOVAS y P. PUIG MUSET. Investigaciones sobre los efectos fungicidas y fungistaticos de los acidos grasos obtenidos del cabello humano del adulto. *Medicina Clinica*, 1948, 10, 380.
2. — X. VILANOVA, F. G. VALDECASAS, M. CASANOVAS y P. PUIG MUSET. Las propiedades fungicidas y fungistaticas de los acidos grasos. Acido undecilenico. Ensayos experimentales y clinicos. *Medicina Clinica*, 1948, 11, 224.
3. — X. VILANOVA. El tratamiento de las epidermomicosis por los acidos grasos (acido undecilenico y otros). *Progresos Terap. Clin.*, 1948, 2, 1.
4. — X. VILANOVA y M. CASANOVAS. Untersuchungen über fungistatische und fungizide Mittel. *Tagung der Deutsche Dermatologische Gesellschaft Hamburg*, 15 Sept. 1948.
5. — X. VILANOVA y M. CASANOVAS. Acción fungistatica y fungicida de las esencias vegetales y de otros perfumes. *Soc. Vasco-Navarra-Aragonesa de la A. Esp. Dermat. y Sifil.* Zaragoza 25-X-1948. Publicado en « *Acta Dermo-Sifil.* », vol. XL (sous presse).
6. — W. E. WOOLDRIGE. Gamma isomer of hexachlorocyclohexane in treatment of scabies. *J. of Invest. Derm.*, 1948, 10, 396.

- M. BENSON CANNON & M. E. McREA. Treatment of scabies. Report of one hundred patients treated with hexachlorocyclohexane in a vanishing cream base. *J. A. M. A.*, 1948, 138, 557.
7. — A. LOZANO MORALES. Nota previa sobre un nuevo metodo de lucha antilarvaria con el hexacloruro de benceno (666). *Rev. San. Hig. Pub.*, 1946, 20, 456.
 8. — S. KIRKWOOD & P. H. PHILLIPS. The antiinositol effect of γ -hexachlorocyclohexane. *J. Biol. Chem.*, 1946, 163, 251.
 9. — H. W. BUSTON, S. E. JACOBS & A. GOLDSTEIN. Cause of physiological activity of « gammexane ». *Nature*, 1946, 158, 22.
 10. — R. E. SLADE. Gamma-isomer of hexachlorocyclohexane (gamma-hexane). An insecticide with outstanding properties. *Chem. and Ind.*, 1945, 64, 314.
 11. — P. PUIG MUSET. El concepto de lipotropia y su importancia terapeutica. *Acta Med. Hisp.*, 1947, 1.
 12. — D. W. WOOLEY. Recent advances in the study of biological competition between structurally related compounds. *Physiol. Rev.*, 1947, 27, 302.
 13. — B. DE MEILÓN. Effect on some blood-sucking Arthropods of gammexane when fed to a rabbit. *Nature*, 1946, 158, 839.
 14. — R. L. METCALF. Relative toxicities of isomeric hexachlorocyclohexane and related materials to thrips. *J. Econ. Entomol.*, 1947, 40, 522.
 15. — D. DRESDEN & B. J. KRIJGSMAN. Physiological action of contact insecticides. *Bull. Entomol. Research.*, 1948, 38, 575.
 16. — CL. FROMOGEOT & M. CONFINO. Hexachlorocyclohexane and meso-inositol. The action of α , β , γ and δ -hexachlorocyclohexane on various bacteria. *Biochem. et Biophys. Acta.*, 1948, 2, 142 (Ref. *Chem. Ab.*, 1948).
 17. — P. CHOIX & L. LACROIX. The action of γ - and δ -hexachlorocyclohexane on the eggs of the sea urchin before and after fertilization. *Bioch. et Biophys. Acta*, 1948, 2, 86 (Ref. *Chem. Ab.*, 1948).
 18. — M. R. STETTEN & DE WITT STETTEN JR. Biological conversion of inositol into glucose. *J. Biol. Chem.* 1946, 164, 85.
 19. — J. NEEDHAM. Studies on inositol. *Bioch. J.*, 1923, 17, 422.

J. F. HEYMANS INSTITUTE OF PHARMACOLOGY. UNIVERSITY OF GHENT
(BELGIUM). DIRECTOR : PROF. DR. C. HEYMANS

PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF THE DIETHYLAMINO-ETHYL ESTER OF PHENYLCYCLOPENTANE CARBOXYLIC ACID (Parpanit), ATROPINE AND TETRAETHYLAMMONIUM ON THE VASOMOTOR PROPERTIES OF ACETYLCHOLINE

BY

G. R. DE VLEESCHHOUWER ⁽¹⁾ AND R. VERBEKE ⁽²⁾

(Received for publication 18-2-1949).

The actions of acetylcholine upon the mammalian organism are extensive and diverse. In 1914, DALE (1), in a study on the pharmacological effects of choline esters, suggested a new classification of their actions, which is now generally adopted: the muscarine-like and the nicotine-like actions.

The muscarine-like actions of acetylcholine can be briefly summarized as follows: acetylcholine produces an increased secretion of the salivary, lacrimal and intestinal glands and also of the sweat glands; it induces a fall of blood pressure, due to dilatation of the vessels, slowing of the heart, constriction of the bronchioles and contraction of the muscular wall of the alimentary tract, the uterus and the urinary bladder. All these effects—exactly reproduced by muscarine—are due to stimulation of the peripheral endings of the post-ganglionic fibers of the parasympathetic nerves; exception must be made however for the sweat glands which are anatomically supplied by fibers of the sympathetic system, and also for the vasodilator effects, since the presence of autonomic vasodilator fibers in the peripheral blood vessels is still a matter of discussion. All these muscarine-like actions of acetylcholine are suppressed by the injection of atropine.

The nicotine-like actions of acetylcholine are due to stimulation, followed by paralysis, of the autonomic ganglia of the sympathetic as

(1) (2) Fellows of the Belgian National Research Foundation.

well as of the parasympathetic system. These nicotine-like actions are demonstrable only when the muscarine-like actions of acetylcholine have been previously eliminated by atropine. In these conditions, the injection of large doses of acetylcholine produces a rise of blood pressure and very often an increase of the heart rate. These effects are abolished when the ganglia of the sympathetic nerves have been paralysed by nicotine.

Two recently synthesized drugs are known to paralyse some parts of the autonomic nervous system; they are : the diethylaminoethyl ester of phenylcyclopentane carboxylic acid (Parpanit) and tetraethylammonium (Etamon).

The present report gives the results of two series of experiments, undertaken in order to examine the influence of Parpanit, atropine and Etamon upon the vasodilator and the vasopressor effects of acetylcholine.

METHODS

The experiments were performed on chloralosed dogs. The blood pressure was recorded manometrically from the femoral artery. The respiration was registered by means of the pneumograph of Marey. In some experiments the peripheral vasomotor reactions were recorded by means of the 3-manometers-method. All drugs were injected intravenously.

RESULTS

1. — *Influence of Parpanit on the Vasodepressor and the Vasopressor Effects of Acetylcholine.*

In their experimental study on the pharmacology of Parpanit, HEYMANS and DE VLEESCHHOUWER (2) showed that Parpanit may paralyse both the synapses and the peripheral elements of the post-synaptic fibers of the parasympathetic and also the synapses of the sympathetic vasomotor system. The paralysis of these different parts of the autonomic system depends upon the injected doses of Parpanit. Thus, doses of Parpanit, ranging from 0,5 to 3 mg/kg, only paralyse the parasympathetic synapses; higher doses, from 3 mg/kg, also paralyse the postsynaptic parasympathetic fibers. The paralysis of the sympathetic synapses is observed after the injection of still higher doses of parpanit, e.g. 20 to 50 mg/kg.

With regard to the cardiac and vascular actions of acetylcholine, HEYMANS and DE VLEESCHHOUWER (2) observed that the cardiac slowing, produced by the injection of a moderate dose of acetylcholine, is suppressed by 10 mg/kg of Parpanit. In these conditions, however, acetylcholine still induces a fall of blood pressure. Even after larger doses of Parpanit, injection of acetylcholine produces a hypotension. These authors never observed a reversal of the vasodilator into a vasopressor action of acetylcholine after Parpanit.

The absence of the vasopressor effect of acetylcholine after high doses of Parpanit is definitely due to the paralysis of the sympathetic vasomotor synapses by this drug. Moreover, from the above mentioned data, it is evident that Parpanit does not antagonize the vasodilator effect of acetylcholine. In this respect, Parpanit seems to be different from atropine. Indeed, REID HUNT (3) first showed that the vasodilator action of acetylcholine may be diminished or prevented by atropine. The abolishment of the vasodepressor effect of acetylcholine by atropine has since been generally admitted.

In a first series of experiments the influence of Parpanit on the vasopressor and vasodilator actions of acetylcholine has been further investigated.

It should be noted first that the dose of Parpanit, paralysing only the parasympathetic synapses, may vary largely in different animals. Moreover, it is not always possible to obtain a definite dissociation between the paralysis of the synapses and the paralysis of the post-synaptic elements of the parasympathetic system.

The influence of increasing doses of Parpanit upon the cardiac and vascular effects of acetylcholine, can be described as follows :

In the normal dog, injection of acetylcholine induces a slowing of the heart and a marked vasodilatation.

Injection of a small dose of Parpanit (3 to 5 mg/kg) completely suppresses the bradycardia due to acetylcholine; the fall of blood pressure however is not altered by this dose of Parpanit.

At a second stage, and after higher doses of Parpanit (8 to 15 mg/kg), the hypotension caused by acetylcholine, progressively diminishes until a certain dose of Parpanit is reached, after which the same dose of acetylcholine induces neither a rise nor a fall of blood pressure. At this moment, the vasomotor tone in the peripheral circulation of the dogs hind leg sometimes still shows a slight decrease, sometimes however a slight increase; very often a diphasic reaction is observed : a primary transient rise immediately followed by a slight fall of vasomotor tone.

The same changes in the peripheral vasomotor tone may also be

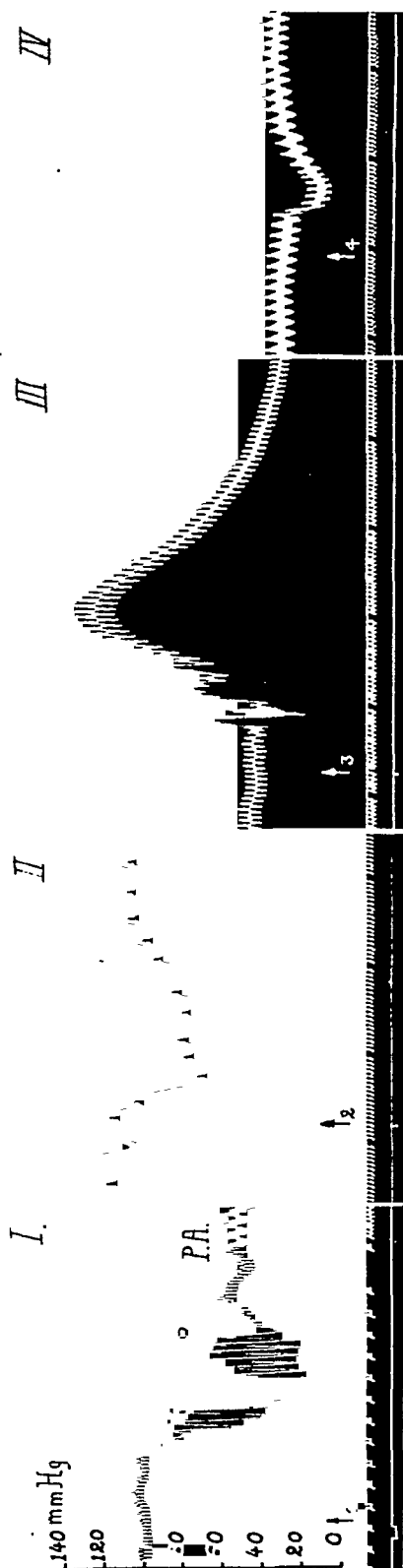


FIG. 1

Dog, 7 kg. Morphine-chloralose anesthesia.

Bilateral cervical vagotomy.

P.A.: systemic arterial blood pressure.

I, \uparrow_1 : intravenous injection of 3 mg acetylcholine: slowing of the heart and fall of blood pressure.

Between I and II: intravenous injection of 3 mg parpanit/kg.

II, \uparrow_2 : intravenous injection of 3 mg acetylcholine: no bradycardia but still marked hypotension.

Between II and III: intravenous injection of 6 mg parpanit/kg (total dose: 9 mg/kg).

III, \uparrow_3 : intravenous injection of 9 mg acetylcholine: marked hypertension.

Between III and IV: intravenous injection of 15 mg parpanit/kg (total dose: 24 mg/kg).

IV, \uparrow_4 : intravenous injection of 9 mg acetylcholine: slight fall of blood pressure.

observed at the next stage, where either the dose of Parpanit has been slightly increased or a larger dose of acetylcholine has been injected. We then may observe a marked rise of systemic blood pressure. The hypotensive action of acetylcholine is thus converted by Parpanit into a hypertensive effect.

The final stage is observed when acetylcholine is injected after still higher doses of Parpanit (25 to 50 mg/kg): we then observe again a fall of blood pressure by acetylcholine. It must be emphasized however that this final vasodilatation by acetylcholine is never as marked as the one observed at the first stage, i.e. after small doses of Parpanit.

2. — *Influence of Atropine and Tetraethylammonium (Etamon) on the Vasodepressor and Vasopressor Effects of Acetylcholine.*

As already mentioned, atropine may suppress and even reverse the vasodilator action of acetylcholine (REID HUNT, 3). The reversal of the hypotensive effect of acetylcholine is generally attributed to paralysis of the peripheral dilator elements by atropine.

ACHESON and MOE (4) and BOELAERT (5) showed that tetraethylammonium (Etamon) is a strong synapticolytic agent. Indeed, a dose of 20 to 25 mg/kg of Etamon paralyses both the parasympathetic and the sympathetic synapses.

In a second series of experiments, we have studied the influence of atropine and Etamon on the vasopressor and vasodepressor actions of acetylcholine.

The experimental results can be summarized as follows :

A very small dose of atropine (e.g. 0,01 mg/kg) abolishes the cardiac slowing, produced by a moderate dose of acetylcholine, but does not suppress the hypotensive effect of acetylcholine.

This hypotensive effect of acetylcholine progressively diminishes and finally disappears after higher doses (0,05, 0,1 to 0,2 mg/kg) of atropine.

A still higher dose of atropine (0,3 mg/kg) or a higher dose of acetylcholine is necessary to obtain the hypertensive effect of acetylcholine.

This hypertensive effect of acetylcholine in the atropinized dog can however again be converted into a hypotension by injection of Etamon (20 mg/kg): this dose of Etamon readily paralyses the sympathetic vasomotor synapses.

Here too it must be noted that the final hypotension, induced by acetylcholine after the consecutive injections of atropine and Etamon, is not so marked as the one observed after the first small doses of atropine.

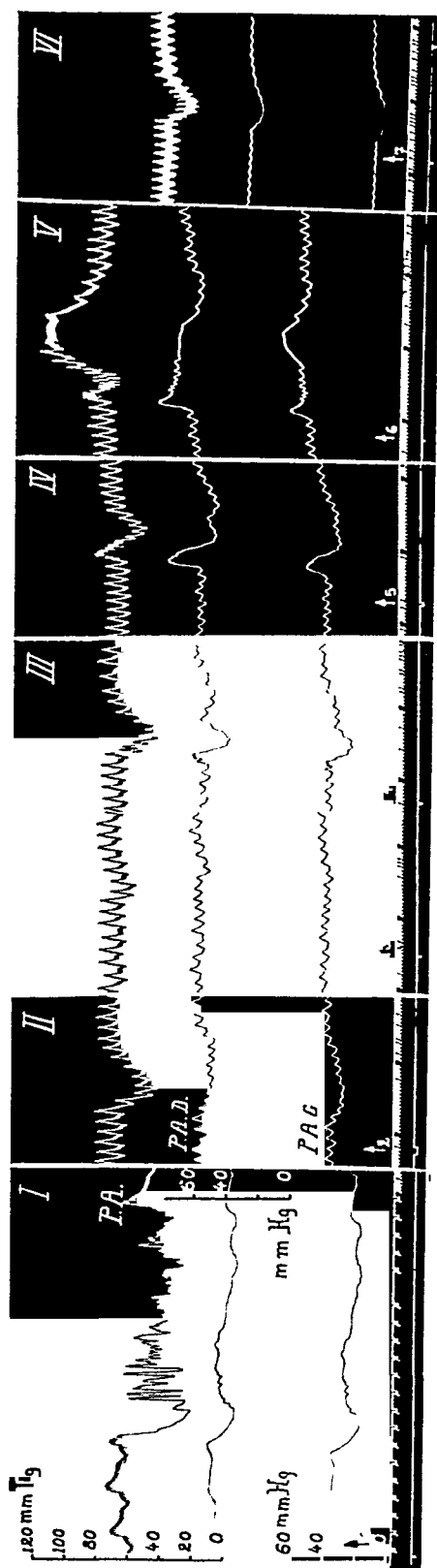


FIG. 2

Dog, 25 kg. Morphine-chloralose anesthesia.

Bilateral cervical vagotomy.

P.A.: systemic arterial blood pressure.

P.A.D.: peripheral arterial pressure in the right hind leg.

P.A.G.: peripheral arterial pressure in the left hind leg.

I, \uparrow_1 : intravenous injection of 1 mg acetylcholine: slowing of the heart and fall of blood pressure.

Between I and II: intravenous injection of 0.5 mg atropine.

II, \uparrow_2 : intravenous injection of 1 mg acetylcholine: no bradycardia but still marked hypotension.

Between II and III: intravenous injection of 0.5 mg atropine.

III, \uparrow_3 : intravenous of 1 mg acetylcholine: very slight vasodilatation.

III, \uparrow_4 : intravenous injection of 5 mg acetylcholine: marked fall of blood pressure.

Between III and IV: injection of 8 mg atropine.

IV, \uparrow_5 : intravenous injection of 10 mg acetylcholine: diphasic reaction; first slight hypertension and vasoconstriction, then fall of pressure and vasodilatation.

Between IV and V: intravenous injection of 8 mg atropine.

V, \uparrow_6 : intravenous injection of 20 mg acetylcholine: marked rise of blood pressure and vasoconstriction.

Between V and VI: intravenous injection of 15 mg tetraethylammonium/kg.

VI, \uparrow_7 : intravenous injection of 20 mg acetylcholine: slight fall of blood pressure,

Furthermore we have observed that the final hypotension, produced by acetylcholine after the atropine-Etamon association, cannot be altered any more by very large doses of atropine (e.g. 1,5 mg/kg).

DISCUSSION

It has been noted that acetylcholine, when injected intravenously, has two quite distinct actions upon the blood pressure: its muscarine-like effect, which tends to cause a fall of blood pressure and which is peripheral in origin, and its nicotine-like effect, which tends to produce a rise of blood pressure, due to stimulation of the sympathetic vasomotor synapses and to a release of epinephrine. It is clear that the final response of blood pressure to the injection of acetylcholine will depend upon the respective intensity of these two opposite components.

Owing to the very marked vasodilator action of acetylcholine in the normal dog, the injection of this drug always causes a fall of blood pressure in normal conditions.

Atropine, by paralysing the vagal and muscarinic effects, prevents both the slowing of the heart and the fall of blood pressure, due to acetylcholine. Hence, after atropine, acetylcholine can affect the blood pressure only by its stimulating action on the sympathetic ganglia, which means a rise of blood pressure. The reversal of the hypotension into a hypertension suggested the suppression of the vasodilator action of acetylcholine by atropine.

Our experiments shed a new light on these phenomena and their classical interpretation.

It is evident that both Parpanit and atropine may abolish, to an important degree, the vasodilator effect of acetylcholine. In this manner it is possible to induce the reversal of the acetylcholine-hypotension into a hypertension, after Parpanit and atropine.

However, the administration of high doses of Parpanit or of Etamon after atropine, clearly shows that the vasodilator effect of acetylcholine had never been completely abolished by Parpanit or atropine. Indeed, after paralysing the sympathetic synapses by larger doses of Parpanit or of Etamon after atropine, acetylcholine again produces a fall of blood pressure, which cannot be suppressed even by very large doses of Parpanit or atropine.

This hypotension is however—as mentioned above—less marked as the one obtained after small doses of Parpanit or atropine.

Hence it appears that the vasodilatation caused by acetylcholine is due to two different pharmacological mechanisms: one vasodilator mechanism is readily abolished by Parpanit or atropine at doses which suppress all muscarinic effects of acetylcholine; the other vasodilator effect remains unaffected by Parpanit and atropine even in very large doses.

Parpanit and atropine are similar in their action upon the vasodilator properties of acetylcholine.

SUMMARY

Experiments performed on chloralosed dogs show that:

1) After small doses of the diethylaminoethyl ester of phenylcyclopentane carboxylic acid or Parpanit (3-5 mg/kg) the cardio-inhibitory effects of acetylcholine are suppressed; acetylcholine still induces, however, a marked fall of blood pressure; after higher doses of Parpanit (8-15 mg/kg) this hypotension progressively diminishes and finally disappears. A larger dose of acetylcholine may now produce a rise of blood pressure. Still larger doses of Parpanit (25-50 mg/kg) again convert this hypertension into a hypotension, which is, however, less marked than the one induced by acetylcholine after small doses of Parpanit.

2) Small doses of atropine (0,01 mg/kg) suppress the cardiac slowing, caused by acetylcholine. These doses of atropine do not suppress the hypotension induced by acetylcholine. Higher doses of atropine (0,05-0,1-0,2 mg/kg) progressively suppress and convert the acetylcholine-hypotension into a hypertension. This hypertension may however be converted again into a hypotension, if tetraethylammonium (20 mg/kg) is injected. This final hypotension is not affected by high doses of parpanit or atropine, but is not so marked as the hypotension induced by acetylcholine after small doses of Parpanit or atropine.

3) The arterial hypotension induced by acetylcholine is due to two mechanisms: one is abolished by Parpanit or atropine, the other is unaffected by these drugs, even in large doses.

4) Parpanit and atropine are similar in their actions on the vasodilator properties of acetylcholine.

REFERENCES

1. — DALE, H. H. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 1914, 6, 147.
2. — HEYMANS, C. and DE VLEESCHHOUWER, G. *Arch. intern. pharmacodyn.*, 1948, 75, 307.
3. — HUNT, R. *Am. J. Physiol.*, 1918, 45, 231.
4. — ACHESON, G. H. and MOE, G. K. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 1945, 84, 189.
5. — BOELAERT, R. *Arch. intern. pharmacodyn.*, 1948, 75, 417.

LAB. BIOCHIMIE, CENTRE BIOCHIMIE, UNIV. GAND

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE L'ANTAGONISME IONIQUE EN CHIMIOTHÉRAPIE (*With Summary*)

PAR

L. MASSART

(Travail reçu le 24-2-1949).

INTRODUCTION

Il y a toute une série de substances, qui doivent leur activité biochimique en tout ou en partie à la propriété de présenter une charge positive ou négative portée par une grosse molécule. En ce qui concerne la charge négative c'est notamment le cas pour l'héparine, le céphaline, les acides nucléiques. Les colorants basiques, (dont il existe différents types), la streptomycine, le sulfate de protamine, certains alcaloïdes doivent sûrement du moins en partie leur activité à leur charge positive. On peut concevoir la charge comme un groupement conductophore amenant les grosses molécules chargées au site auquel elles pourront exercer leur activité. A l'existence de la charge peuvent éventuellement s'ajouter d'autres propriétés spécifiques pour une structure déterminée.

Nous avons déjà cité certains résultats dans deux brèves notes préliminaires (1 et 2) (1). Comme la plupart des expériences ont été faites avec des acridines et plus spécialement avec la tryptaflavine, répétons brièvement les constations expérimentales à ce sujet.

C'est principalement à ALBERT, RUBBO et collaborateurs, que nous devons des connaissances fondamentales au sujet du mécanisme de l'activité antibactérienne des acridines. Nous rappelons plus spécialement ici la compétition entre les ions H^+ et les ions acridine (3). McILWAIN (4) et WAGNER-JAUREG (5) on décrit l'antagonisme entre les acides nucléiques et les nucléotides d'une part et les acridines d'autre part, ainsi que la formation in vitro de composés définis entre ces mêmes

(1) Dans une de ces notes, notamment celle dans « *Nature* », la concentration de la streptomycine a été donné en molgr., alors qu'on doit lire gr. par l.

substances. Divers auteurs (6) ont constaté que les acridines, et les colorants basiques en général, inhibent la respiration de micro-organismes et possèdent de ce fait, ce que nous appellerons un effet bactéricide directe. Cette inhibition de la respiration est annulée en présence d'acide nucléique, de nucléotides, de cozymase (7).

Nous avons démontré que différents cations peuvent entrer en compétition pour un même substrat cellulaire, tel que les ribonucléoprotéides (8). Parmi ces cations citons les colorants basiques, le sulfate de protamine, la quinine, la streptomycine, les cations métalliques. Nous avons prouvé en outre qu'en présence de cations métalliques l'inhibition de la respiration des levures, provoquée par les colorants basiques est atténuée ou annulée. SILVERMAN et EVANS (9) travaillant sur la croissance de *E. COLI* ont obtenu récemment des résultats analogues, en démontrant que l'inhibition de cette croissance provoquée par l'atébrine, disparaît en présence de CaCl_2 et de MgCl_2 .

Nos résultats sur la compétition entre cations sont l'expression d'un antagonisme biologique. L'antagonisme a été particulièrement bien étudié en ce qui concerne les relations entre les métabolites et leurs antagonistes, qui sont des analogues au point de vue structural. Dans notre cas il s'agit d'un antagonisme dû à des analogies de charge : on peut prévoir que des cations ne possédant aucun pouvoir inhibiteur de la respiration pourront annuler l'action inhibitrice d'autres cations, qui eux ralentissent la respiration. Ayant prouvé antérieurement le pouvoir détoxifiant des cations métalliques, nous étudierons ici ce même pouvoir pour la spermine et accessoirement pour la streptomycine (¹). En somme les phénomènes que nous décrirons se réduisent à un échange de cations, dont les uns (acridines, blue de méthylène, etc.) inhibent la respiration et les autres (spermine, streptomycine etc.) pas.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Tous nos résultats ont été obtenus au moyen de la méthode de Warburg. Toutes les expériences ont été faites à 28° C et avec des levures de boulangerie de la firme « Levure Royale » de Bruges.

Les godets de Warburg contenaient invariablement 2 ml de liquide, dont 1 ml d'une suspension de levure à 1 % dans KH_2PO_4 M/20 et 0,1 ml de glucose 10 %. Les 0,9 ml restant contenaient les inhibiteurs et les substances détoxifiantes.

(¹) Ne disposant que du produit à usage clinique, c'est à dire sans garantie de pureté chimique, nous avons limité volontairement nos expériences avec la streptomycine.

Les résultats sont exprimés en μl d'oxygène par heure. Nous avons employé de la streptomycine Squibb sous la forme du chlorhydrate.

1. — *Expériences avec la trypaflavine comme inhibiteur.*

a) *Influence de la spermine.*

Contrôle	Spermine à concentr. indiquée		Trypaflavine $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$	Trypaflavine $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ + spermine à concentr. indiquée	
271	$1 \cdot 10^{-2}\text{M}$	265	75	$1 \cdot 10^{-2}\text{M}$	242
271	$1 \cdot 10^{-2}\text{M}$	265	75	$2 \cdot 10^{-3}\text{M}$	264
219	$2 \cdot 10^{-3}\text{M}$	232	91	$2 \cdot 10^{-3}\text{M}$	213
219	—	—	91	$4 \cdot 10^{-4}\text{M}$	201
219	$4 \cdot 10^{-4}\text{M}$	218	102	$4 \cdot 10^{-4}\text{M}$	228
219	$4 \cdot 10^{-4}\text{M}$	218	102	$8 \cdot 10^{-5}\text{M}$	155
229	$1 \cdot 10^{-2}\text{M}$	233	86	$1 \cdot 10^{-2}\text{M}$	236

b) *Influence de la streptomycine.*

Contrôle	Streptomycine à concentr. indiquée		Trypaflavine $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$	Trypaflavine $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ + streptomycine à concentr. donnée	
233	$2,5 \cdot 10^{-3}$	236	62	$2,5 \cdot 10^{-3}$	97
260	$1,25 \cdot 10^{-2}$	241	65	$1,25 \cdot 10^{-2}$	188
273	—	—	117	$6,25 \cdot 10^{-3}$	202
273	—	—	117	$2,5 \cdot 10^{-3}$	143

c) *Influence de l'agmatine et de l'arcaïne.*

Contrôle	Trypaflavine $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$	Trypaflavine $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ + agmatine $2,5 \cdot 10^{-3}$	Trypaflavine $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ + arcaïne $1,25 \cdot 10^{-3}$
273	117	153	157

d) *Influence de la cadavérine.*

Contrôle	Trypaflavine $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$	Cadavérine $2,5 \cdot 10^{-3}$	Trypaflavine $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ + cadavérine $2,5 \cdot 10^{-3}$
233	70	234	135
222	62	216	120

e) *Influence du bleu de méthylène.*

Contrôle	Bleu de méthylène à concentr. indiquée		Trypaflavine $5.10^{-4}M$	Trypaflavine $5.10^{-4}M$ + bleu de méthylène à concentr. indiquée
273	$5.10^{-4}M$	216	122	80
252	$1,25.10^{-4}M$	240	96	65

f) *Influence de la quinine.*

Contrôle	Quinine $2,5.10^{-3}$		Trypaflavine $5.10^{-4}M$	Trypaflavine $5.10^{-4}M$ + quinine $2,5.10^{-3}$
218	128		70	53

Considérations sur les résultats obtenus avec la trypaflavine comme inhibiteur.

Nous constatons que certaines substances basiques, même à des concentrations élevées, n'inhibent pas la respiration des levures. C'est le cas pour la spermine, la streptomycine, l'agmatine, l'arcaïne, la cadavérine. Toutes ces substances annulent soit totalement, soit partiellement l'inhibition de la respiration produite par la trypaflavine.

D'autres substances basiques inhibent la respiration des levures. C'est le cas pour le bleu de méthylène et la quinine. Les inhibitions produites s'ajoutent dans ce cas. Il est particulièrement intéressant de constater que le bleu de méthylène à une concentration à laquelle il n'inhibe pas, ne produit aucune détoxification, mais au contraire aggrave l'inhibition. Ceci indique que l'inhibition du bleu de méthylène et celle par la trypaflavine sont dues à un même mécanisme.

2. — *Expériences avec le bleu de méthylène comme inhibiteur.*a) *Influence de la spermine.*

Spermine à concentr. indiquée		Bleu de méthylène $1.10^{-3}M$	Bleu de méthylène $1.10^{-3}M$ + spermine à concentr. indiquée
$1.10^{-2}M$	208	81	$1.10^{-2}M$ 196
$1.10^{-3}M$	236	76	$1.10^{-3}M$ 243
$2.10^{-4}M$	246	84	$2.10^{-4}M$ 188

b) *Influence de la streptomycine.*

Streptomycine à conc. indiquée		Blue de méthylène $1.10^{-3}M$	Bleu de méthylène $1.10^{-3}M$ + streptomycine à concentr. indiquée
1.10^{-2}	230	62	1.10^{-2} 214
1.10^{-2}	241	71	1.10^{-2} 239

3. — *Expériences avec le sulfate de protamine comme inhibiteur.**Influence de la spermine.*

Dans ces expériences les levures étaient suspendues dans de l'eau distillée.

Spermine à concentr. indiquée		Protamine 2.10^{-4}	Protamine 2.10^{-4} + spermine à concentr. indiquée
$1.10^{-2}M$	243	162	$1.10^{-2}M$ 252
$1.10^{-3}M$	226	141	$1.10^{-3}M$ 202

4. — *Expériences avec le violet de cristal.**Influence de la spermine.*

Spermine à concentr. indiquée		Violet de cristal $1.10^{-4}M$	Violet de cristal $1.10^{-4}M$ + spermine à concentr. indiqué
$1.10^{-2}M$	219	67	$1.10^{-2}M$ 192
$1.10^{-3}M$	234	81	$1.10^{-3}M$ 153

5. — *Expériences avec la quinine.**Influence de la spermine.*

Contrôle	Quinine 1/400	Quinine 1/400 + spermine à concentr. indiquée	
242	108	$8.10^{-3}M$	232
256	121	$1,6.10^{-3}M$	186

DISCUSSION

Nous avons démontré que la spermine, et accessoirement la streptomycine, sont à même d'annuler l'inhibition de la respiration des levures que provoquent la trypaflavine, le bleu de méthylène, le violet de cristal, le sulfate de protamine et la quinine. Nous admettons que les cathions streptomycine et spermine non toxiques pour cette respiration entrent en compétition avec les cathions toxiques trypaflavine, bleu de méthylène, violet de cristal, sulfate de protamine et quinine pour un même siège à charge négative.

La question se pose toutefois pourquoi les colorants basiques par exemple sont des inhibiteurs, alors que la streptomycine et la spermine ne le sont pas. Nous ne pouvons donner une réponse précise à cette question en ce moment. Notons en passant que la même question se pose dans les antagonismes par analogie structurale : on comprend très bien que la pyrithiamine par exemple déplace la thiamine, mais on ne sait pas pourquoi la pyrithiamine ne puisse pas remplacer la thiamine en ce qui concerne les fonctions catalytiques.

Dans les antagonismes biologiques en tout cas, il faut tenir compte :

1) de l'analogie structurale ;

2) de l'analogie de la charge, laquelle est à la base des phénomènes de l'échange de cathions et donne lieu à l'antagonisme ionique.

Nos résultats sont à rapprocher de ceux de SILVERMAN et EVANS (10), qui en étudiant l'inhibition de la croissance de *E. COLI* par l'atébrine ont constaté le pouvoir détoxifiant de certaines polyamines, et de ceux de SNELL (11), sur le pouvoir détoxifiant de polyamines vis-à-vis de la propamidine.

RÉSUMÉ

L'inhibition de la respiration des levures provoquée par la trypaflavine, le bleu de méthylène, le violet de cristal, le sulfate de protamine et la quinine est annulée par l'addition de spermine et, dans les cas étudiés, par la streptomycine. Il est donné une discussion sur la signification de ces résultats et l'importance de la charge est soulignée.

SUMMARY

The inhibition of the respiration of yeast caused by trypaflavine, methylene blue, crystal violet, protamine sulfate and chinine disappears by addition to the medium of spermin and in the cases which have been examined also by streptomycin, agmatine, arcaïne and cadaverine.

The significance of these results and the importance of the charge of these basic substances is discussed. It is proposed to call the observed facts as due to "ion antagonism".

Je remercie Madame J. WUYTS pour l'aide matérielle au cours de ces expériences. Mes remerciements vont également à la Ella Sachs Plotz Foundation pour son appui financier et à la Firme Hoffmann-Laroche de Bâle pour avoir mis à ma disposition de la spermine.

BIBLIOGRAPHIE

1. — MASSART, L. *Arch. int. Pharmacodyn. Thér.*, 1948, 77, 88.
2. — MASSART, L. *Nature*, 1948, 162, 778.
3. — ALBERT, A., RUBBO, S. D., GOLDACRE, R. J., DAVEY, M. E. et STONE, J. D. *Brit. J. Exp. Path.*, 1945, 26, 160.
4. — MC ILWAIN, H. *Biochem. J.*, 1941, 35, 311.
5. — WAGNER JAUREGG, TH. *Zeits. physiol. Chem.*, 1936, 239, 188.
6. — BERNHEIM as quoted by ALBERT, A. *Brit. J. Exp. Path.*, 1945, 26, 160.
- FERGUSON et THORNE. *J. Pharmacol.*, 1946, 86, 258.
- MASSART, L., PEETERS, G., DE LEY, J. et VERCAUTEREN, R. *Experientia*, 1947, 3, 154.
7. — MARTIN, G. et FISCHER, O. V. *J. Lab. Clin. Med.*, 1944, 29, 383.
- DE LEY, J., PEETERS, G. et MASSART, L. *Biochim. Biophys. Acta*, 1947, 1, 393.
8. — MASSART, L., PEETERS, G. et WUYTS-ROBIETTE, J. *Arch. int. Pharmacod. Thér.*, 1947, 75, 141.
9. — SILVERMAN, M. et EVANS, E. A. *J. Biol. Chem.*, 1944, 154, 521.
10. — SILVERMAN, M. et EVANS, E. A. *J. Biol. Chem.*, 1948, 172, 849.
11. — SNELL, E. E. *J. Biol. Chem.*, 1944, 152, 475.

FROM THE DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY, UNIVERSITY OF CHICAGO
CHAIRMAN : E. M. K. GEILING

« IN VIVO » ACTION OF MORPHINE,
URETHANE AND PHENOBARBITAL ON THE GLYCOGEN
SYNTHESIS FROM GLUCOSE IN THE RAT LIVER ⁽¹⁾

BY

ERNEST KUN AND L. G. ABOOD

(Received for publication 7-2-1949).

INTRODUCTION

FISHER and STERN (1), OMSBEE and FISHER (2), and FISHER and HENRY (3) observed that cell division and respiration were affected independently by various concentrations of urethane, since cell division was arrested by narcotic concentrations which did not alter respiration seriously. BURRIS and WILSON (4) found that dinitrophenol inhibited the assimilation of glucose by the root nodule bacterium while it did not affect respiration. This finding is in accordance with the previous work of CLIFTON and LOGAN (5) who observed that glucose assimilation is more sensitive to inhibitors (sodium azide or dinitrophenol) than oxygen uptake. In luminous bacteria narcotics inhibited assimilation prior to respiration; moreover respiration was even increased by these concentrations of narcotics as reported by McELROY (6). These examples [see further references in McELROY's review (7)] suggested that synthetic energy-consuming reactions of living systems appear to be more sensitive to certain inhibitors than the energy-yielding oxidation.

In order to study the narcotic sensitivity of a synthetic reaction *in vivo*, we chose the highly active liver tissue of the rat in which all the necessary factors for optimal tissue function are readily available. The comparison of these results with those obtained in isolated systems remains to be further investigated.

⁽¹⁾ Aided by a grant from the Office of Naval Research N6ORI-20, Task Order 11.

A preliminary report was presented before the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics in April 1949.

MATERIALS AND METHODS

The effect of morphine, urethane, and phenobarbital on the glycogen formation in the rat liver was determined under experimental conditions similar to those recently reported by KUN (8). Under these conditions the rate of glycogen deposition in the rat liver was found to approach a maximum five hours after glucose administration; therefore, this time interval between glucose administration and glycogen measurement was chosen. The drugs were given one hour before glucose feeding. Morphine was injected subcutaneously while urethane and phenobarbital were given intraperitoneally. All the drugs were dissolved in a small volume of isotonic saline. Care was taken so that the largest volume injected did not exceed about 2.5 ml. This amount of saline has no detectable effect on liver glycogen.

In experiments where labile compounds are being determined in animal tissues special care has to be taken during the removal of tissue samples. One has to realize that the quantitative distribution of metabolites is always affected by the trauma which is inevitable in such cases. This is especially true of contractile tissues. Relatively constant experimental conditions can be brought about if the whole animal is frozen in liquid air or nitrogen as described by LE PAGE (9, 10). Even under such conditions it takes about 40 seconds until the whole rat is completely frozen (9). Since in these experiments our interest was focused on the analysis of the liver only, after various attempts we came to the conclusion that it was not necessary to freeze the whole animal, for the removal and freezing of a liver sample can be carried out with proper assistance in 15 to 30 seconds. A sudden blow on the skull of a rat completely paralyzes it for 20 to 30 seconds after which time violent convulsions occur. These few seconds before the onset of convulsions permit the removal of a liver sample, whereupon it is immediately frozen in dry ice, homogenized and extracted with ice cold trichloroacetic acid. The analytical procedure employed in the estimation of carbohydrate intermediates was carried out according to the methods outlined by LE PAGE (9) and UMBREIT (11). Pyruvic acid was determined by the method of FRIEDEMANN and HAUGEN (12), lactic acid according to BARKER and SUMMERSON (13), and phosphopyruvic acid as described by LOHMANN and MEYERHOF (14). The reducing values were measured by the method of FOLIN and MALMROS (15) and phosphorus analysis carried out according to FISKE and SUBBAROW (16). Fructose was determined by the method of ROE (17), pentose by the

orcinol procedure of MEIBAUM (18), the latter reaction being carried out for 20 minutes in a boiling water bath. Ribose was used as pentose standard. The acid insoluble fractions, such as nucleic acid, lipid and protein phosphorus were determined according to SCHNEIDER (19). The following intermediates were determined: adenosinetriphosphate (ATP), adenosinediphosphate (ADP), hexosediphosphate (HDP), glucose 1-phosphate, glucose-6-phosphate, triose phosphates, phosphopyruvic, pyruvic and lactic acids, pentose phosphate, and glycogen. Each determination was carried out in duplicate. The results were expressed in micrograms per gram of tissue.

RESULTS

It was established in preliminary studies that a normal male white rat, weighing between 380 and 350 gm., synthesized 35 to 41 mg of glycogen/gm. liver tissue in 5 hours after 48 hours starvation if 3 ml of concentrated glucose solution were given by stomach tube. The degree of glycogen synthesis was found to be quite constant indicating that the glucose as substrate was present in excess and that the metabolic pattern of the animals was uniform. In the first series of experiments the effect of various amounts of drugs was determined on the glycogen deposition in the rat liver. Three groups of rats received varying amounts of morphine, urethane, and sodium phenobarbital one hour before glucose administration. Results are presented in fig. 1 where at least three animals were used in establishing one experimental point. Five hours after glucose administration the animals were sacrificed and the liver glycogen determined. With each series of animals controls receiving only glucose and only the drug but no glucose were kept under the same conditions. The control starving animals with or without the drugs contained an equally low amount of liver glycogen, varying between 400 and 500 ug/gm. indicating that the narcotics had no effect on the starving glycogen level of the rat liver. If, however, glucose was given to the animals which received drugs, an increasing dose of narcotic produced an increasing inhibition of glycogen deposition. The most striking effect was elicited by morphine which in a dose of 10 mgm/kgm caused a 90 % inhibition of glycogen synthesis, while larger doses completely blocked the glycogen deposition. Similar results were obtained with urethane. This drug, however, is much less potent if we consider that 10 times the amount was injected. Phenobarbital in the same dose as was used in the case of morphine produced

the least inhibition, although 5 mgm/kgm phenobarbital had some inhibitory effect. It is of interest to compare the pharmacological action of these drugs with their inhibitory action. In this respect urethane is quite unique in that doses up to 600 to 700 mgm/kgm have very little or no narcotic action on the rat. Doses above this range cause some narcosis, but surgical anesthesia was only brought about by the highest dose employed. The narcotic range of phenobarbital was found to be quite narrow (approximately 80 to 100 mgm/kgm). Below this dose phenobarbital also exhibited an inhibitory effect which was less than that of the other drugs. Larger doses of phenobarbital were frequently lethal; therefore, we did not include these data. On the other hand very little or no glycogen could be detected in those rats surviving the five hour experimental period with a dose of 120 to 150 mgm/kgm phenobarbital, indicating that a complete inhibition can be achieved by larger toxic doses.

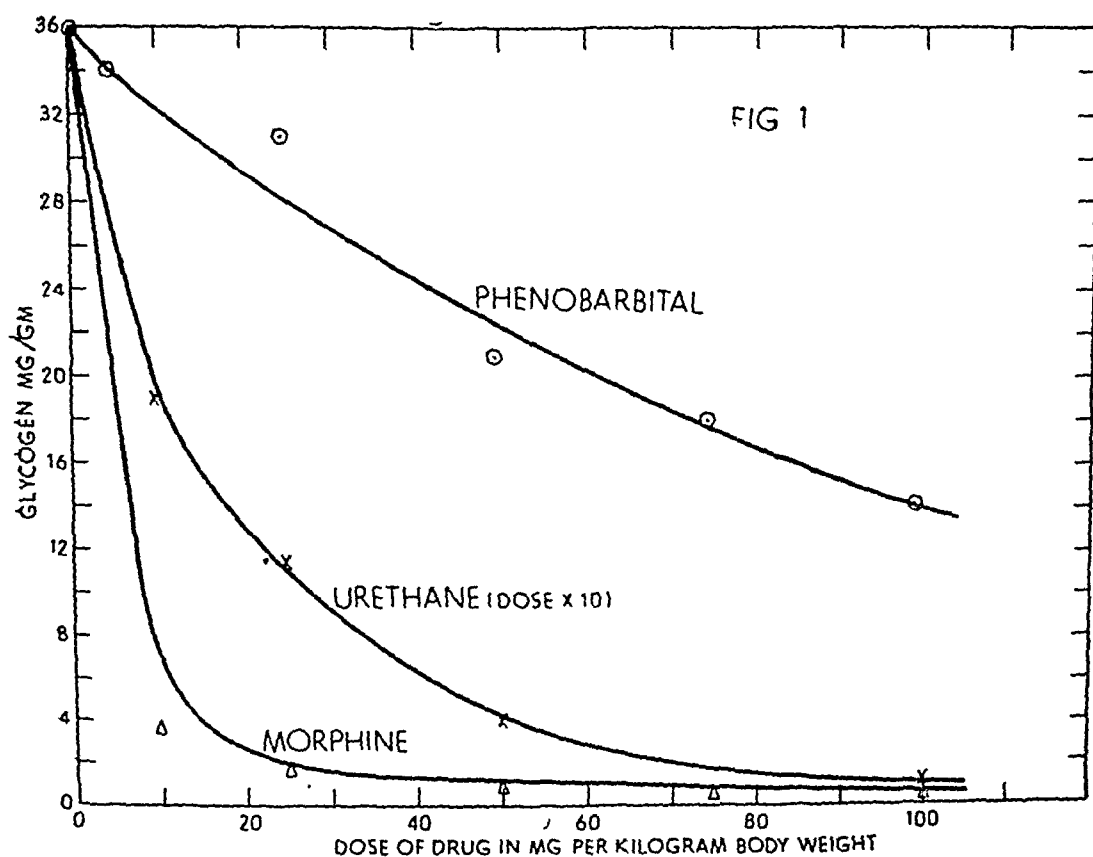
Morphine in low doses had little apparent effect on rats while higher doses produced a characteristic catatonia-like muscular rigidity and lack of spontaneous motility. Since morphine has a well-known inhibitory effect on the motility of and passage through the gastro-intestinal tract, we investigated whether or not this local effect was responsible for the observed inhibition of glycogen deposition. A series of animals were given 1.0 gm glucose/kgm intraperitoneally every hour for five hours. Morphine caused the same inhibition of liver glycogen deposition as in animals fed by stomach tube, indicating that the inhibition is due to a metabolic effect of the drug.

In the second series of experiments, tissue fractionations were performed on livers of starving and glucose-fed rats and the effect of the drugs determined on both groups. The results are summarized in fig. 2, where each column represents the average of 3 or 4 animals. Two parallel samples of each liver, weighing 0.8 to 1.5 gm, were simultaneously fractionated. The individual differences between animals were not greater than 20 % of the means.

We studied the effect of the highest doses of the drugs which in the previous experiments did not prove to be lethal in the course of the usual experimental period. These doses were 100 mgm/kgm morphine sulfate, 100 mgm/kgm phenobarbital and 1 gm/kg urethane. As mentioned previously phenobarbital and urethane produced surgical anesthesia while the morphinized rats were catatonic and did not react to otherwise painful stimuli.

As a general rule it could be ascertained that the three drugs studied had a much more pronounced effect on the concentration of intermediate

metabolites in the glucose fed animals than in the starving ones. Since the liver glycogen level of starving animals was not affected by the drugs, these results were not surprising. These observations fall in line with the findings of LE PAGE (9, 10) who observed that 50 mgm/kgm phenobarbital had no effect on carbohydrate intermediates but rather preserved a situation, probably closer to the physiological state of tissues



as indicated by the higher ATP and phosphocreatine content. It must be pointed out, however, that LE PAGE analyzed his animals only three minutes after the injection of pentobarbital, while it was found in our laboratory that continuous injection of pentobarbital, sufficient to cause narcosis for five hours, inhibited glycogen deposition in the liver similar to phenobarbital.

Detailed analysis of the data revealed the following results : Morphine had the most conspicuous effects. In starving animals there was some increase in ADP while phosphopyruvic and lactic acid increased markedly. An increase in ATP and lactic acids was observed in glucose fed animals, while phosphocreatine was markedly lower than in the normal glucose-fed animals. In glucose fed morphinized animals as

well as in starving ones only traces of hexosemonophosphates were found, and hexosediphosphate, triose phosphate, and pyruvate were also below the controls. Pentose phosphate was low in the morphinized animals. Urethane and phenobarbital had somewhat similar effects. There was little ATP in the livers of both groups while the ADP was higher, varying in the same range as in the controls. The behavior of liver phosphocreatine was the reverse of that in the controls, i.e. there was a high phosphocreatine content in starving animals while in the glucose fed ones a marked decrease occurred. Pentose phosphates were lower in both groups as compared to the normals, but this decrease can be considered significant only in the urethane animals. In the glucose fed animals the glucose 6-phosphate was somewhat increased. Hexose diphosphate was significantly elevated by urethane in glucose fed animals, while in those animals receiving phenobarbital the opposite effect was observed. Pyruvic acid was increased, while lactic acid was not markedly affected by urethane. In the phenobarbital treated and glucose fed animals a marked increase in lactic acid was found. In both urethane and phenobarbital groups only traces of liver phosphopyruvate could be detected.

Since these metabolites represent the bulk of tissue carbohydrates, it was possible to determine the effect of the drugs on the total carbohydrate balance in the liver of the starved and glucose fed animals. In tables I and II the carbohydrate intermediates were converted into

TABLE I

The effect of three drugs on carbohydrate balance in starving animals in terms of glucose equivalents mgm/gm

(Animals sacrificed six hours after drug administration)

	Normal	Morphine 100 mgm/kgm	Urethane 1 gm/kgm	Phenobarbital 100 mgm/kgm
Glycogen	0.475	0.540	0.465	0.500
Glucose 1-PO ₄	0.059	0.000	0.046	0.035
Glucose 6-PO ₄	1.060	0.000	1.050	1.070
Fructose 6-PO ₄	0.120	0.000	0.038	0.029
Fructose 1,6-PO ₄	0.085	0.025	0.194	0.154
Triose-PO ₄	0.062	0.024	0.039	0.220
Phosphopyruvic acid	0.068	0.470	0.000	0.000
Pyruvic acid	0.005	0.001	0.008	0.013
Lactic acid	0.020	0.100	0.025	0.050
Total	1.924	1.180	1.865	2.071
% Decrease of total carbohydrates		39	3	0

glucose equivalents. In starving animals (TABLE I) only morphine had a significant effect (41 % decrease) on tissue carbohydrates, while urethane decreased them only slightly (18 %) and phenobarbital had no measurable effect. On the other hand, in glucose fed rats a marked reduction of tissue carbohydrates occurred in the narcotized animals (TABLE II).

TABLE II

The effect of three drugs on carbohydrate balance in glucose-fed animals in terms of glucose equivalents mgm/gm

(Animals sacrificed six hours after drug administration)

	Normal	Morphine 100 mgm/kgm	Urethane 1 gm/kgm	Phenobarbital 100 mgm/kgm
Glycogen	39.000	0.355	1.100	16.000
Glucose 1-PO ₄	0.059	0.000	0.042	0.029
Glucose 6-PO ₄	1.020	0.000	1.840	1.560
Fructose 6-PO ₄	0.120	0.000	0.065	0.110
Fructose 1,6-PO ₄	0.093	0.040	0.120	0.200
Triose-PO ₄	0.064	0.024	0.220	0.118
Phosphopyruvic acid	0.000	0.160	0.000	0.000
Pyruvic acid	0.005	0.003	0.125	0.014
Lactic acid	0.074	0.250	0.045	0.150
Total	40.435	0.832	3.557	18.281
% Decrease of total carbohydrates		98	91	55

It is well known that during the synthesis of tissue carbohydrates a decrease of free phosphate occurs. Since during the tissue fractionation the inorganic phosphorus (calcium precipitable) is actually determined, the over all esterification can be calculated (TABLE III). While in

TABLE III

Over all phosphorylation in rat liver during five hour glycogen synthesis following glucose
(Animals sacrificed 6 hours after drug administration)

Drug	Starving	Glucose Fed	Per Cent Esterification
Normal	270	0-10	+ 99-100
Morphine	290	310	-7
Urethane	301	370	-28
Phenobarbital	202	210	-4

Results are expressed in terms of micrograms of inorganic phosphorus per gm of liver.

normal glucose fed rat livers the inorganic P is completely esterified during five hour periods of glycogen synthesis, no esterification occurs in the drug treated animals. Moreover, there was a 28 % increase of inorganic P in the urethane treated rats. Since these data actually represent an equilibrium at the time of the analysis, it cannot be ascertained whether or not this behavior of inorganic P is due primarily to

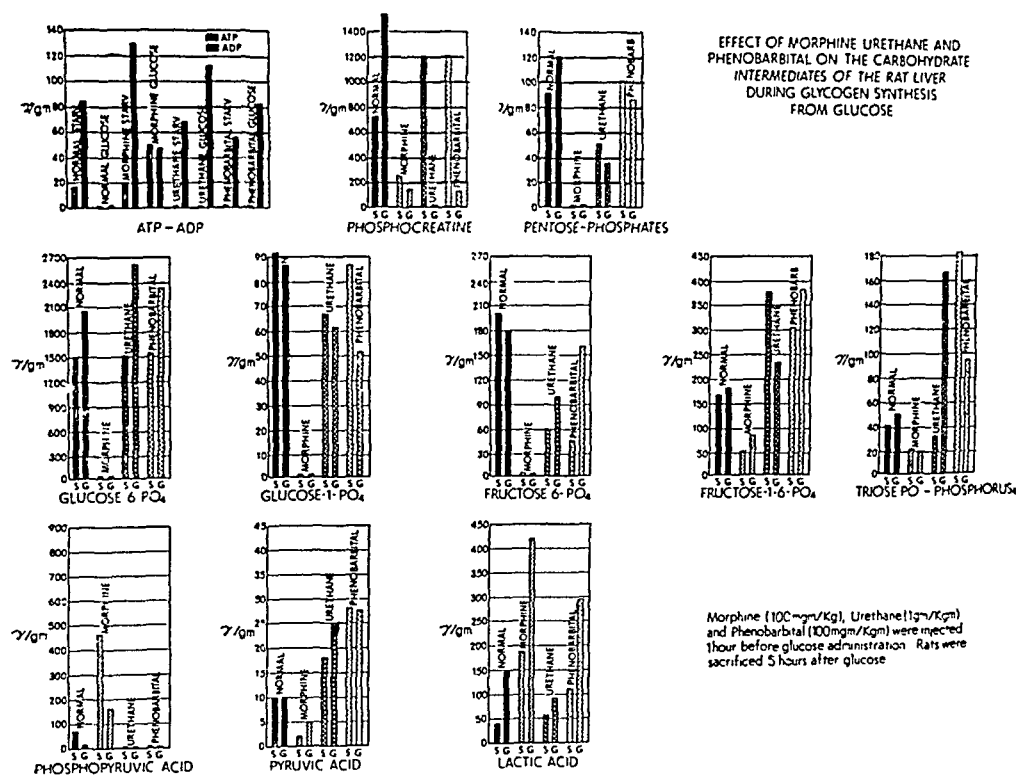


FIG. 2

an increased breakdown or inhibition of esterification. It remains to be further investigated which of these mechanisms is the primary factor involved.

On a separate group of animals the effect of the drugs on the acid insoluble tissue fractions was determined. The information which could be expected from these analyses was of particular interest, since the acid insoluble fractions represent structurally as well as functionally important cell constituents. A marked decrease in lipid and nucleoprotein P could be observed as a result of the action of all three drugs studied (TABLE IV).

TABLE IV

*The effect of the three drugs on the acid insoluble phosphorus
(mg P/gm tissue)*

(Animals sacrificed 6 hours after drug administration)

	Lipid P Phospholipid		Nucleid Acid P		Phosphoprotein P	
	Starved	Glucose	S	G	S	G
Normal	1.12	0.90	1.58	1.59	0.380	0.120
Morphine 100 mgm/kgm	0.097	0.195	0.169	0.238	0.244	0.122
Urethane 1 gm/kgm	0.190	0.162	0.102	0.225	0.126	0.220
Phenobarbital 100 mgm/kgm	0.075	0.108	0.202	0.263	0.104	0.102

S — starving

G — glucose fed

CONCLUSIONS

On the basis of experiments presented in this paper, it can be stated that urethane, morphine, and phenobarbital inhibit the synthesis of liver glycogen in the intact animal. Since the deposition of glycogen in mammalian tissues can be regarded as a process biochemically similar to the glucose assimilation in lower organisms, the inhibition of glycogen synthesis in the rat liver is biologically comparable to the inhibition of assimilation. The inhibition of glycogen deposition was demonstrable with doses of narcotics too small to exert their typical pharmacologic action. These observations might have clinical and toxicological interest, since they suggest a lack of carbohydrate utilization due to the effects of these drugs. Since the quantitative distribution of intermediate metabolites was different depending on the drug used, it can be assumed that each drug has its specific mode of action in spite of the fact that their pharmacologic effect might be similar.

How far the specific biochemical action of these drugs can be correlated with their analgesic or narcotic effect remains to be further investigated. It is of special interest that the resting liver metabolism of the starved animals was generally little affected by morphine, urethane, and phenobarbital while their effect became greatly apparent during the active synthetic process of glycogen deposition.

SUMMARY

1) Morphine, urethane and phenobarbital injected one hour before glucose administration by stomach tube inhibit the glycogen formation in the rat liver. The degree of inhibition is a function of the amount of drug.

2) The quantitative distribution of carbohydrate intermediates during glycogen synthesis differs in each group of animals, depending on the drug, suggesting that the biochemical action of the drugs on metabolic reactions is different.

3) All three drugs tested cause a marked decrease in the acid insoluble nucleic acid and phospholipid phosphorus of the rat livers.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Die Glycogensynthese in der Rattenleber aus Glukose wird durch Morphin, Urethan und Phenobarbital gehemmt, wenn diese Substanzen eine Stunde bevor Glukosefütterung parenteral dargereicht werden. Die Grösse der Hemmung ist von der Dose der genannten Substanzen abhängig.

2) Die quantitative Verteilung der intermediären Kohlenhydratstoffwechselprodukte ist in allen drei experimentellen Gruppen verschieden. Dieses Resultat führt zur Schlussfolgerung dass Morphin Urethan und Phenobarbital je eine molekularspezifische biochemische Wirkung haben.

3) Alle drei Substanzen haben eine ausgeprägte Wirkung auf den Säureunlöslichen Nucleotid und Phospholipid Phosphorgehalt der Rattenleber, indem sie eine beträchtliche Abnahme hervorrufen.

* * *

Acknowledgement: The authors wish to express their thanks to Dr. J. M. COON for his helpful criticism of this paper.

BIBLIOGRAPHY

1. — K. C. FISHER and J. R. STERN. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1942, 19, 109.
2. — R. A. OMSBEE and K. C. FISHER. *J. Gen. Physiol.*, 1943, 27, 461.
3. — K. C. FISHER and R. T. HENRY. *J. Gen. Physiol.*, 1943, 27, 469.
4. — R. H. BURRIS and P. W. WILSON. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1942, 19, 361.
5. — C. E. CLIFTON and W. A. LOGAN. *J. Bact.*, 1939, 37, 523.
6. — W. D. MCELROY. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1944, 23, 171.
7. — W. D. MCELROY. *Quart. Rev. Biol.*, 1947, 22, 25.

8. — E. KUN. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, 68, 496.
9. — C. A. LE PAGE. *Am. J. Physiol.*, 1946, 146, 267.
10. — C. A. LE PAGE. *Am. J. Physiol.*, 1946, 147, 446.
11. — W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS and J. F. STAUFFER. *Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism* (Burgess Publ. Co., Minneapolis).
12. — T. E. FRIEDEMANN and G. E. HAUGEN. *Jour. Biol. Chem.*, 1943, 147, 415.
13. — T. B. BARKER and W. H. SUMMERSON. *Jour. Biol. Chem.*, 1941, 138, 535.
14. — K. LOHMANN and O. MEYERHOF. *Biochem. Z.*, 1934, 273, 60.
15. — O. FOLIN and H. MALMROS. *Jour. Biol. Chem.*, 1929, 83, 115.
16. — C. H. FISKE and Y. SUBBAROW. *Jour. Biol. Chem.*, 1925, 66, 375.
17. — T. H. ROE. *Jour. Biol. Chem.*, 1943, 107, 15.
18. — W. MEIBAUM. *Zeitschr. & Physiol. Chem.*, 1939, 258, 117.
19. — W. C. SCHNEIDER. *Jour. Biol. Chem.*, 1945, 161, 293.

AUS DEM PHARMAKOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT HEIDELBERG
LEITER : PROF. DR. F. EICHHOLTZ

EINE EINFACHE METHODE DER MYOGRAPHIE UND DEREN ANWENDUNG

VON

F. EICHHOLTZ, R. HOTOVY u. H. ERDNISS

(Eingegangen am 22-2-1949).

Durch die Synthese neuer, auf die quergestreifte Muskulatur wirksamer Körper, wie z.B. von Parpanit und Myanesin, wurde die Frage dringend, ob durch einfache Versuchsanordnung am intakten Versuchstier eine pharmakologische Auswertung und Differenzierung solcher Stoffe durchgeführt werden kann. Zur Registrierung der Muskelleistung an der Ratte dienten bisher die Verfahren von EVERSE-DE FREMERY (1), INGLE (2), VOEGTLI (3). Das dort angewandte Prinzip besteht in elektrischer Reizung des N. ischiadicus mit Registrierung der Kontraktion des M. gastrocnemius. Diese Verfahren wurden hauptsächlich zur Testierung der NN-Rindeninsuffizienz herangezogen. Andere gröbere Methoden, die einen Leistungswert der quergestreiften Muskulatur geben, sind der Schwimm- und Lauftest. Im Folgenden sei eine Versuchsanordnung dargestellt, die mit einfachsten technischen Mitteln und ohne operative Eingriffe am gleichen Tier wiederholt eine pharmakologische Prüfung muskelwirksamer Stoffe ermöglicht.

METHODIK

Eine Ratte im Gewicht zwischen 120-250 g wird mit 1,5 ccm einer frisch angesetzten 3 %igen Avertinlösung/100 g Ratte subcutan injiziert. Nach Einschlafen des Tieres werden in 2 Schwanzvenen Kanülen (Nr. 18 oder 20) eingebunden und mit einem Stöpsel verschlossen, nachdem die Durchgängigkeit der Kanülen und Venen durch Injektion

von physiol. Kochsalzlösung geprüft wurde. Dann wird die Ratte auf dem Brett, das an den beiden Längsseiten je 2 schräge, 3 mm breite und 6-8 cm lange Schlitze aufweist, mittels vier 1 cm breiten Gummischlaufen (von einem alten Fahrradschlauch stammend) an den Beinen fixiert (ABB. 1). Die Gummischlaufen werden dabei durch die

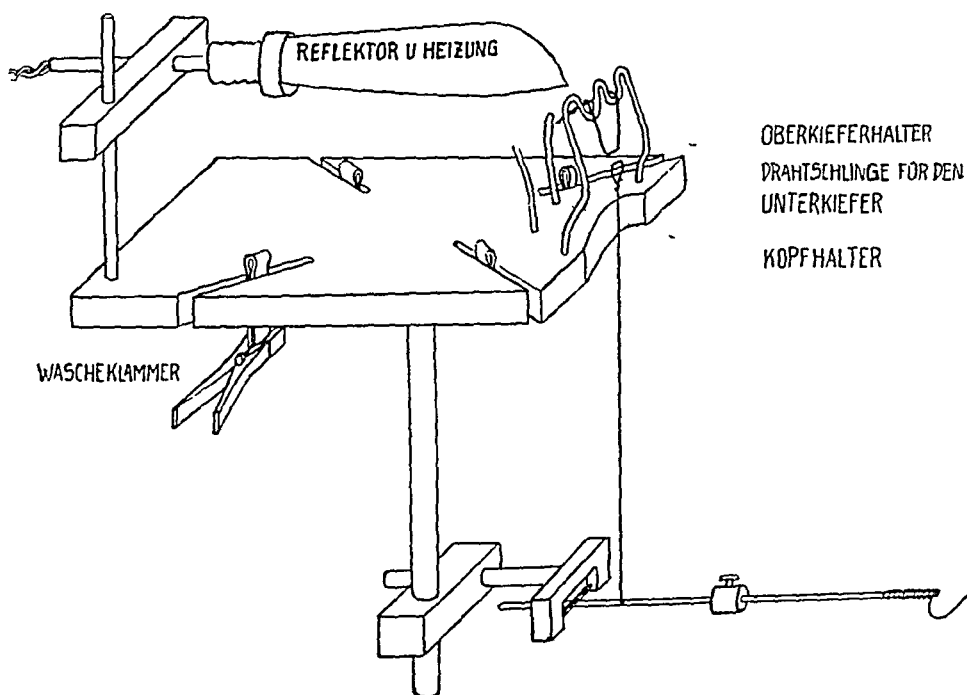


ABB. 1

Schlitze geführt und mit Patentwäscheklammern unterhalb des Brettes festgeklemt. Der Schwanz mit den beiden eingebundenen Kanülen ruht ebenfalls auf dem Brett. Zur Fixierung des Kopfes am Brett dienen 2 Drahtstifte beiderseits des Halses, die oben auseinanderweichen und über die ein Gummiring gestülpt wird. Die oberen Nagezähne werden mittels einer Drahtschlinge nach oben gehalten, die durch einen am Brett befestigten Bügel unterstützt wird; an den unteren Nagezähnen wird die Drahtöse des 15 cm langen und 0,9 mm starken, starren Verbindungsdrahtes zum Schreibhebel angebracht. Damit die Drahtöse beim Federn nicht aushakt, wird ein kurzer Gummischlauch nach Einlegen der Öse über die beiden Nagezähne gestülpt. Das Übersetzungsverhältnis der Ausschläge durch den Hebel betrug 1 : 10 bei einer Belastung im Durchschnitt von 50-60 g. Die Ratte wird von oben her elektrisch gewärmt. Die Massetermuskulatur wird jede Sekunde entweder durch Kondensatoren entladung oder durch gleich starke Induktionsstromstöße über Nadelelektroden gereizt. Während des Ver-

suches muss Avertin nachgespritzt werden, sobald spontane Bewegungen des Masseters auftreten.

Die Avertinlösung muss für die weiteren Injektionen im Thermostaten gehalten werden, um das Ausfallen des Tribromäthylalkohols zu verhindern. Bei einzelnen Tieren ist eine brauchbare Narkosetiefe nicht zu erzielen gewesen.

BEISPIELE ZUR ANWENDUNG DIESER METHODE

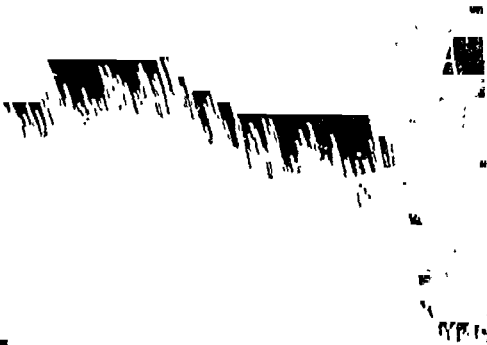
1. — *Die Wirkung der Leuchtgas- und Stickoxydulerstickung auf die Muskeltätigkeit des M. masseter.*

Durch Zufuhr von reinem Leuchtgas durch die Atmungstätigkeit konnte gezeigt werden, dass die Muskelleistung mit Beginn der Erstickung kurz zunimmt (Notfallfunktion durch die Adrenalinausschüttung) und dann dauernd abnimmt (ABB. 2). Wurde die Zufuhr von Leuchtgas nach Eintritt des Atmungsstillstandes unterbrochen, so trat mit Beginn der Atmung eine zunehmende Leistungssteigerung der Kaumuskulatur auf. Bei wiederholten Erstickungsversuchen kann es bei manchen Versuchstieren zum Auftreten von Kollapsen kommen, die durch künstliche Atmung mit reinem O_2 raschestens behoben werden konnten. Jeder Kollaps ist durch rasches Abfallen der Muskelleistung charakterisiert. Bei Zufuhr von reinem Stickoxydul trat ebenfalls nach einer bestimmten Einwirkungsdauer eine Verminderung der Muskelleistung auf, wobei in den meisten Fällen die erwähnte kurze Steigerung der Muskelleistung, die auf das Auslösen der Notfallfunktion hinweist, fehlte. Dies weist wohl auf eine Anlähmung der Notfallfunktion durch N_2O hin.



ABB. 2

Ratte, männl., 150 g Gewicht, mit 3 ccm 3%iger Avertinlösung, subcutan, narkotisiert. Bei 1 Leuchtgasatmung, bei 2 2 Min. lange künstliche Beatmung mit Sauerstoff. Die übrigen Pfeile bedeuten 5 Min. lange Pausen, wobei das Kymographion stillstand. Minutenschreibung und Atmungsregistrierung.



Myogramm A :

A = Atemfrequenz in der Minute.

- 1 = i.v. Injektion von 10 γ Prostigmin, (Lös. 1 : 20 000).
- 2 = i.v. Inj. von 2 mg Myanesin (Lös. 1 : 100).
- 3 = i.v. Inj. von 2 mg Parpanit (Lös. 1 : 100).



Myogramm B :

- 1 = i.v. Inj. von 2,5 γ Prostigmin (Lös. 1 : 20 000).
- 2 = i.v. Inj. von 150 γ Apoatropinsulfat (Lös. 1 : 1000).
- 3 u. 4 = i.v. Inj. von 200 γ Apoatropinsulfat (Lös. 1 : 1000).



Myogramm C :

- 1 = i.v. Inj. von 5 γ Prostigmin (Lös. 1 : 20 000).
- 2 = i.v. Inj. von 2 mg Atropinsulfat (Lös. 1 : 100).
- 3, 4 u. 6 = je eine i.v. Inj. von 1 mg Atropinsulfat (Lös. 1 : 100).
- 5 = i.v. Inj. von 2 mg Atropinsulfat (Lös. 1 : 100).

Minutenschreibung und Atmungsregistrierung.

Sämtliche Werte sind auf 100 g Gewicht bezogen.

2. — *Die Wirkung von Prostigmin, Parpanit, Myanesin, Curare, Scopolamin, Atropin und Apoatropin auf die Muskeltätigkeit.*

Als weitere Beispiele für die Leistungsfähigkeit des Masseter-Präparates sei die Auswertung der oben angeführten Stoffe wiedergegeben. *Prostigmin*, das bekanntlich eine Steigerung der Muskelleistung hervorruft, weist am Masseterpräparat eine hervorragende Wirkung auf. 1,5-5 γ *Prostigmin*/100 g Gewicht, i.v. verabreicht, erzeugen eine Steigerung der Muskelleistung um das 2-3 fache. Die Atmungstätigkeit wird dabei fast nicht beeinflusst. Antagonisten des *Prostigmin* am quergestreiften Muskel wie *Curare* (MERCK), *Atropin*, *Parpanit* usw. erwiesen sich auch in dieser Versuchsanordnung wirksam. So kann ein Leistungsabfall nach i.v. Injektion von 1-5 mg *Atropin. sulf.*/100 g Ratte, 3,5-5 mg *Myanesin*/100 g, 2 mg *Parpanit*/100 g, 0,1 mg *Curare*/100 g und 0,2 mg *Apoatropin. sulf.*/100 g festgestellt werden. Nach i.v. Verabreichung von 5 mg *Scopolamin. hydrobrom.*/100 g Ratte trat ein antagonistisches Verhalten gegen *Prostigmin* nicht zu Tage, sondern am Präparat konnte nur eine Tonussteigerung der Kaumuskulatur registriert werden. Der Leistungsabfall der Muskulatur des Kauapparates kann immer wieder reproduziert werden, wobei gleichzeitig die Wirkungsdauer der einzelnen Stoffe gut beobachtet werden kann. Kollapszustände oder Atmungsstillstand sind fast immer mit Hilfe von Sauerstoff und künstlicher Atmung zu beheben, da sie nämlich an der verminderten Tätigkeit des M. masseter frühzeitig genug erkannt werden können.

3. — *Testierung der Nebenniereninsuffizienz.*

NN-lose Ratten weisen im Arbeitsversuch eine charakteristische Ermüdungskurve auf. Die bisher angewandten Methoden sind oben angeführt. Im wiedergegebenen Kurvenbild (ABB. 4) soll die Leistung einer Ratte vor und nach der Adrenalektomie gezeigt werden. Vor der Operation blieb die Leistung der Kaumuskulatur über Stunden hinaus nahezu gleichmässig; eine schwere NN-insuffizienz, die am gleichen Tier herbeigeführt wurde, zeigte die charakteristische Ermüdungskurve. Ähnlich wie in den Kurven von VOEGTLI (3) werden zuerst normale Zuckungshöhen erreicht, die aber von rascher Ermüdung gefolgt werden. Der Grad der Insuffizienz wurde auch mit weiteren Methoden gemessen. So zeigte das Tier eine verlängerte Narkosezeit auf Avertin (0,08 g/kg i.v.); diese betrug vor der Operation nur wenige Sekunden (7''), am Tag der Krisis, an dem die obige Leistungskurve aufgenommen wurde, dagegen 12 Minuten. Der Blutdruck — nach MOBERG (4)

gemessen — bewegte sich vor der Operation in den Grenzen von 65-60 mm Hg, am Tag des Versuches betrug er 32 mm Hg. Eine Leistungssteigerung mit Prostigmin konnte in diesem Zustand nicht mehr erzielt werden.

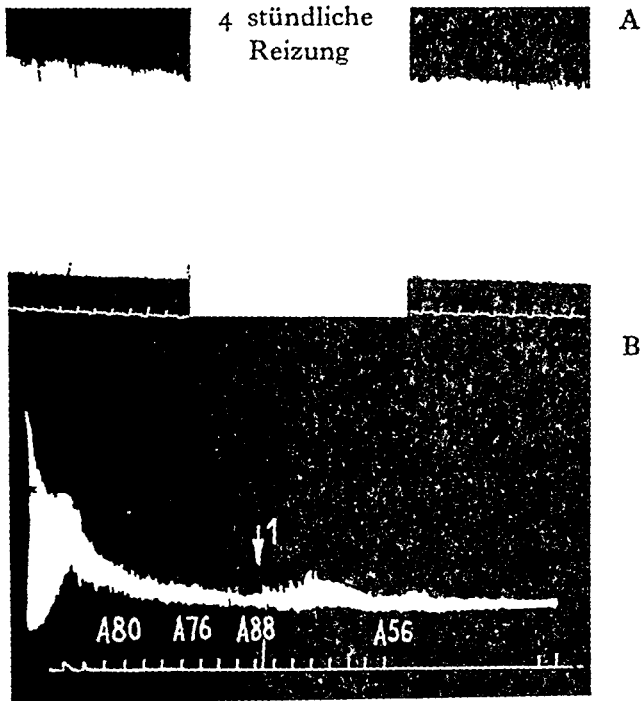


ABB. 4

Ratte, weibl., 170 g Gewicht, mit 1,5 ccm 3%iger Avertinlösung auf 100 g Gewicht, subcutan verabreicht, narkotisiert.

Kurve A: Anfangs- und Endteil des Myogramms nach 4 stündiger Reizung des M. masseter vor der Adrenalektomie.

Blutdruck: 60 mm Hg.

Schlafzeit auf i.v. Injektion v. 0,08 g/kg Avertin 7 Sek.

Kurve B: Myogramm vom selben, aber adrenalectomierten Tier bei schwerer NN-insuffizienz.

Blutdruck: 32 mm Hg.

Schlafzeit auf i.v. Injektion von 0,08 g/kg Avertin 12 Min. (nach NEUKAMM).

DISKUSSION

In einigen Versuchsbeispielen konnte die Brauchbarkeit der neuen Methode der Masseterregistrierung an der Ratte gezeigt werden. Die Vorteile dieser Anordnung bestehen darin, dass die Versuche wiederholt am gleichen intakten Tier, ohne operative Eingriffe, ausgeführt werden können. Curareartige Wirkungen an diesem Präparat sind besonders auffällig nach Vorbereitung des Tieres mit Prostigmin; hier konnten messbare Effekte bei Parpanit, Myanesin, Atropin, Apotatropin

aufgezeichnet und die Intensität und Wirkungsdauer der einzelnen Stoffe miteinander verglichen werden. CUSHNY hat seinerzeit die Meinung vertreten, dass Atropinwirkungen am quergestreiften Muskel des intakten Tieres wegen der Toxizität des Atropins nicht nachweisbar wären; darauf stützt sich wohl auch die landläufige Meinung, dass die Wirkung von Atropin bei PARKINSON-Symptomen auf zentralen Angriff zurückzuführen sind. Diese Meinung muss heute revidiert werden. Die curareartige Wirkung von Parpanit, Myanesin, Atropin, Apotropin kann durch Prostigmingabe wieder aufgehoben werden. Mit Scopolamin dagegen konnte in der gebräuchlichen Dosierung kein curareartiger Effekt erzielt werden; hier ist weiterhin ein zentraler Angriff wahrscheinlich. Durch Erstickung mittels Leuchtgas konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der Sauerstoffversorgung von überragender Bedeutung für die Muskeltätigkeit ist. Jede Art der Anoxämie wird frühzeitig an dem Abfall der Muskelleistung erkannt. Die durch die Erstickung ausgelöste Adrenalinausschüttung (Notfallfunktion) ist auf dem Myogramm als zackenartige Mehrleistung ersichtlich. Die Erstickung durch Stickoxydul lässt in den meisten Fällen ein Fehlen dieser Notfallfunktion erkennen.

Die Versuche an NN-insuffizienten Ratten schliessen sich den Ergebnissen anderer Autoren an. Die verschiedenen Probleme der Muskelpharmakologie, die in der vorliegenden Arbeit nur gestreift wurden, warten der intensiven Bearbeitung.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Eine Methode zur Registrierung der Muskelleistung mit Hilfe der elektrisch gereizten Massetermuskulatur der Ratten wird eingehend beschrieben.

2) Beispiele für die Brauchbarkeit der neuen Methode bei der pharmakologischen Prüfung verschiedener Substanzen werden aufgeführt.

LITERATUR

1. — EVERSE, J. W. u. P. DE FREMERY. *Acta neerl. Phys.*, 1932, 2, 152.
2. — INGLE, D. J. *Endocrinology*, 1944, 34, 191.
3. — VOEGTLI, W. *Helv. Phys. Acta*, 1943, 1, 395; *Helv. Phys. Acta*, 1943, 1, 400.
4. — MOBERG, E. *Skandinavisches Archiv f. Physiologie*, 1934, 69, 221.

AUS DEM PHARMAKOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT WIEN,
VORSTAND : PROF. DR. F. V. BRÜCKE
UND DER UNIVERSITÄTSKLINIK FÜR NEUROLOGIE UND PSYCHIATRIE WIEN,
VORSTAND : PROF. DR. O. KAUDERS

DIE AKTIONSSTRÖME DER SENSIBLEN HERZNERNEN BEI EXPERIMENTELLER HERZINSUFFIZIENZ

VON

F. KAINDL, K. POLZER UND G. WERNER

(Eingegangen am 24-1-1949).

Zusammenhänge zwischen Herzaktion und zentripetalen Aktionsströmen im Halsvagus wurden zuerst von ADRIAN (1) gefunden und in jüngerer Zeit durch direkte Ableitung von den Nervi cardiales inferiores von AMANN und SCHÄFER (2), JARISCH u. ZOTTERMAN (3) sowie in eigenen Versuchen (4) festgestellt. Erhöhung der Innendrucke einzelner Herzabschnitte bewirkt eine Vermehrung der Zahl der Impulse, Senkung hingegen den gegenteiligen Effekt; (5) daraus folgt, dass die von den afferenten Herznerven abzuleitenden Aktionspotentiale durch Erregung pressorezeptorischer Endorgane im Herzen ausgelöst werden. Die Funktion dieser sensiblen Rezeptoren, die von GOORMAGHTIGH u. PANNIER u. a. (6) auch anatomisch in allen Teilen des Herzens nachgewiesen wurden, besteht nach JARISCH u. HENZE (7) darin, dass durch zentripetale Leitung der Erregung der Endorgane eine Anpassung der Herzgrösse an die jeweiligen Kreislaufverhältnisse durch direkten Einfluss des Herzens auf die Reaktionsweise des Vasomotorenzentrums ermöglicht wird. Demnach sind die von den sensiblen Herznerven abzuleitenden Aktionspotentiale ein objektiv registrierbarer Ausdruck für diese funktionellen Zusammenhänge; ihre Veränderungen bei experimenteller Herzinsuffizienz wurden auf Anregung von Herrn Prof. v. BRÜCKE untersucht und sollen im folgenden mitgeteilt werden.

METHODIK

Die Versuche wurden an 25 Katzen und 6 Hunden teils in Äther- u. teils in Chloralosenarkose durchgeführt. Präparation der Herznerven und Ableitung der Aktionsströme erfolgte in der in den früheren Mitteilungen angegebenen Weise (4). In einzelnen Versuchen gelang es, durch Auffasern der zur Ableitung verwendeten Herznerven, die Zahl der leitenden Fasern auf wenige oder eine einzelne zu reduzieren. Bei der langen Versuchsdauer erwies es sich als besonders wichtig, die Körpertemperatur der Versuchstiere konstant zu halten. Zu diesem Zwecke wurde die Lufttemperatur im Abschirmkäfig entsprechend hoch gehalten und die Körpertemperatur der Tiere wiederholt rectal gemessen. Durch Wasserdampfsättigung der Luft wurden das Austrocknen der auf die Elektrode gelagerten Nerven vermieden.

Die Herzinsuffizienz wurde nach M. VOGT (7) durch intravenöse Injektion von Barbitursäurederivaten (Pernocton, Eunarcon, Epivan) erzeugt.

Gleichzeitig mit den Aktionsströmen wurde der Blutdruck aus der Arteria femoralis mittels Hg.-Manometer, das EKG (Pericardklemme zu rechter Vorderpfote), das Herzvolumen mittels Cardiometer bzw. die Vorhofdrucke durch Wassermanometer registriert.

VERSUCHSERGEBNISSE

Unter den im methodischen Teil beschriebenen Versuchsbedingungen können von dem auf die Ableitelektrode gelagerten Nerven während einer durchschnittlichen Versuchsdauer von etwa 2 Stunden weitgehend gleichbleibende Aktionsstrombilder registriert werden. Die Konstanz der Frequenz der afferenten Impulse ist besonders deutlich an Präparaten ersichtlich, die nur eine oder wenige leitende Fasern enthalten. Als Charakteristikum zur Beurteilung, ob die abgeleiteten Aktionsströme sicher nur von einer einzelnen Faser stammen, benutzten wir die strenge Rhythmik der mit gleicher Amplitude aufeinanderfolgenden Entladungen. Es ist sehr bemerkenswert, dass in diesen Fällen keinerlei Beziehung der Aktionsströme zu einer bestimmten Phase der Herzaktion zu erkennen war, wie dies auch in einer Abbildung von AMANN u. SCHÄFER (2) ersichtlich ist. Einzelfaserpräparate, die herzsynchrone Entladungen zeigen, konnten wir nicht beobachten, doch wurden solche von AMANN u. SCHÄFER nachgewiesen. Wenn eine

grössere Zahl von funktionstüchtigen Nervenfasern zur Ableitung gelangt, lassen sich die folgenden Beziehungen zwischen dem Aktionsstrombild und dem synchron registrierten EKG erkennen: während der Vorhof- und Kammersystole sind die Entladungen frequenter, so dass sie zu je einer dem P und QRS des EKG synchronen Gruppe zusammengefasst erscheinen; dazwischen liegt ein Intervall mit geringerer Zahl

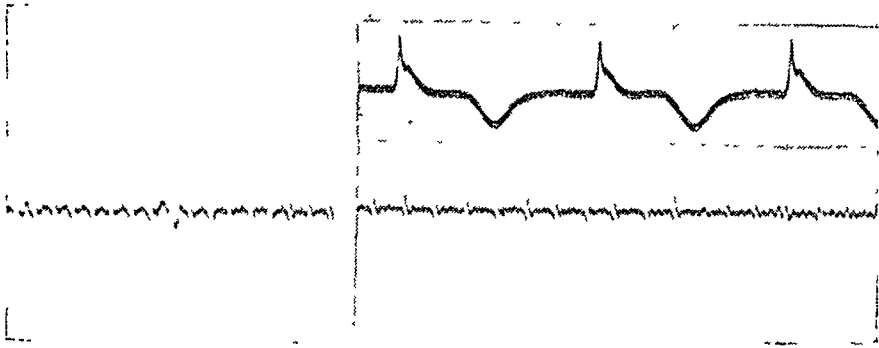


ABB. 1

Oscillogramm einer Einzelfaser der Nn. cardiales infer. dext. und synchron registrierter EKG (obere Kurve).

Katze 2,80 kg. Äthernarkose. Zeit 0,1 sec.

a) Zu Versuchsbeginn.

b) 40 sec. nach Injektion von 30 mg/kg Pernokton in die V. cava. sup.

(Der zeitliche Verlauf der Einzelimpulse ist verzerrt wiedergegeben, da die Registrierung mit einem Schleifenoszillographen erfolgte.)

von Entladungen; in der Mehrzahl der Präparate waren zwischen diesen beiden Entladungsgruppen keine Aktionsströme zu registrieren, so dass die isoelektrische Linie geschrieben wurde. Offenbar hängt dies nur von der Zahl der leitenden Fasern ab, da solche Aktionsstrombilder sowohl von oberen als auch von unteren Ästen der Nn. cardiales inf. beider Seiten abgeleitet werden konnten. Dadurch sind besondere anatomische Zuordnungen als Ursache für die verschiedene Ausbildung des zwischen den beiden Haupt-Entladungsgruppen gelegenen Aktionsstrombildes unwahrscheinlich. Das hier beschriebene Verhalten der Aktionsströme afferenter Herznerven ist bei Hund und Katze gleich.

Wird nun einem solchen Tier, dessen Aktionsströme eines afferenten Herznervenastes während einer längeren Beobachtungszeit unverändert blieben, ein Barbitursäurepräparat (Pernocton 20-40 mg/kg Eunarcon 20-40 mg/kg, Epivan 30-50 mg/kg) in die V. femoralis injiziert, nimmt die Zahl der afferenten Impulse nach einer Latenzzeit von 30 bis 60 Sekunden deutlich ab; in den Versuchen, in denen von Einzelfasern abgeleitet wurde, sind nach dieser Zeit keine Aktionsströme mehr nachzuweisen. Bei Ableitung von mehreren leitenden Nervenfasern ist

die Veränderung des Aktionsstromoszillogrammes entsprechend der Dosis des Barbitursäurederivates verschieden stark; bei hohen Dosen ist auch in diesen Fällen in mehreren Versuchen ein völliges Verschwinden der Aktionsströme zu beobachten gewesen. In einem Teil der Versuche (vorwiegend in den Versuchen mit Katzen nach mehrmaliger Injektion von Barbitursäurepräparaten) konnte etwa 10-20 Sekunden nach der intravenösen Injektion in die V. femoralis eine vorübergehende Frequenzsteigerung der Aktionsströme registriert werden (die nach weiteren 20-40 Sekunden von der früher beschriebenen Frequenzabnahme gefolgt war). Nach einer von der injizierten Dosis abhängigen Dauer von 7-10 Minuten nimmt die Frequenz der Aktionsströme allmählich wieder zu, so dass etwa 15-20 Min. nach der Injektion das anfänglich beobachtete Strombild wiederhergestellt ist. Bei Einzelfaserpräparaten vollzieht sich sowohl das Verschwinden der Aktionsströme als auch ihre Wiederherstellung nach einer vorangehenden Phase geringerer Frequenz ohne Verminderung der Amplitudenhöhe plötzlich. Diese Veränderungen sind am selben Tier durch wiederholte Injektionen mehrmals reproduzierbar. Besondere Unterschiede in der Wirksamkeit der in den angegebenen Dosen verwendeten drei Barbitursäurepräparate Pernocton, Eunarcon und Evipan konnten nicht festgestellt werden. Nach Injektion des Barbitursäurepräparates in die Vena cava sup. wird die Frequenz der afferenten Entladungen schon nach 10-20 Sekunden verringert; ein Intervall mit vorübergehender Frequenzsteigerung war in diesen Versuchen nicht zu beobachten.

Um die zeitlichen Beziehungen zwischen den beschriebenen Veränderungen der Aktionsströme und dem Eintritt der Herzinsuffizienz zu untersuchen, wurde gleichzeitig mit der Registrierung der Aktionspotentiale und des EKG die Cardiometer und Blutdruckkurve aufgenommen. Die Abnahme der Frequenz der Aktionsströme beginnt zu einem Zeitpunkt, in dem der Blutdruck bereits stark abgesunken ist bzw. nach kleineren Barbiturdosen sein tiefstes Niveau erreicht hat. Das Herz ist zu dieser Zeit schon maximal dilatiert. Das Wiederauftreten afferenter Impulse in den sensiblen Herznerven erfolgt erst, nachdem der Blutdruck annähernd den Ausgangswert erreicht hat; die Herzvolumskurve zeigt in dieser Phase noch eine deutliche Herzdilatation an, die erst im Verlaufe von weiteren 5-10 Minuten abnimmt.

Das Verhalten der Vorhofsdrucke nach Barbiturinjektion gibt eine Erklärung für die nach wiederholter Injektion zu beobachtende vorübergehende Vermehrung der Aktionsströme; nur in diesen Fällen stieg der Vorhofsdruck links und rechts während der Dauer der Herzdilatation um 10-20 cm H₂O an; meist waren die Änderungen der

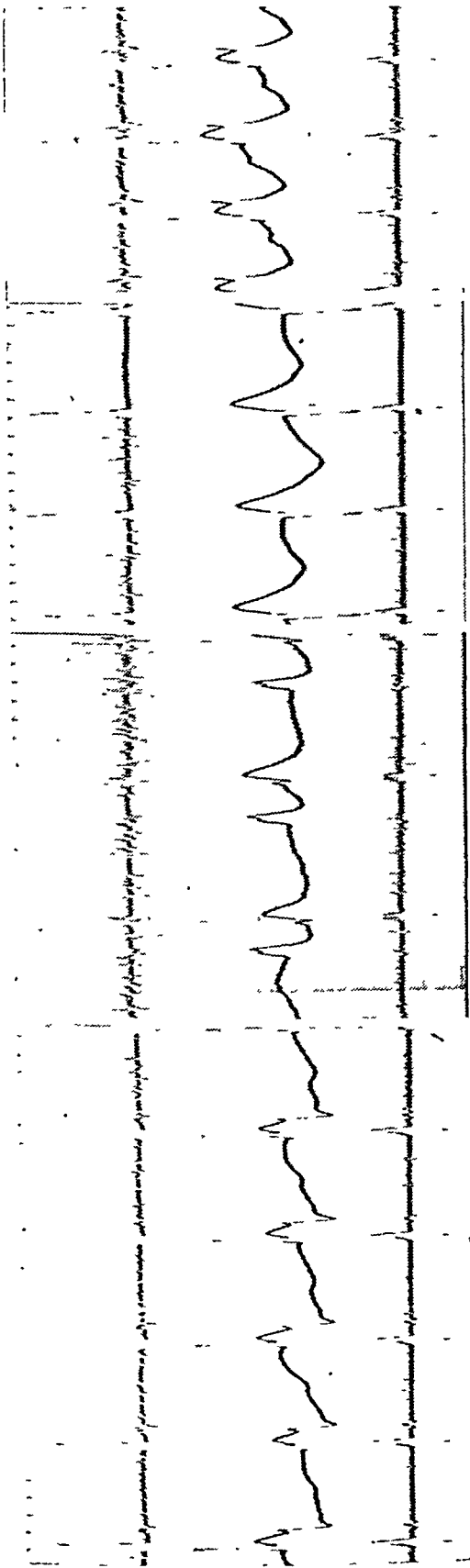


ABB. 2

Obere Kurve: Aktionsströme eines Astes der Nn. card. inf. dext.

Mittlere Kurve: EKG.

Untere Kurve: Aktionsströme eines linken sensiblen Herznervenastes.

Katze 3,1 kg. Äthernarkose. Zeit 0,1 sec.

- a) Zu Versuchsbeginn.
- b) 15 sec. nach Injektion von 20 mg/kg Eunarcon in die V. fem. dext.
- c) 60 sec. nach Injektion von 20 mg/kg Eunarcon in die V. fem. dext.
- d) 16 min. nach Injektion von 20 mg/kg Eunarcon in die V. fem. dext.

(Der Einbruch der Aktionsspannungen der EKG ist durch die Ableitung von undurchschnittenen Nerven bedingt.)

Vorhofsdrucke nach den ersten Injektionen von Barbitursäurederivaten nur sehr gering; oft blieben sie gleich. Eine Phase vermehrter afferenter Entladungen war in diesen Versuchen niemals festzustellen.

Diese Veränderungen der Vorhofsdrucke wurden bereits von ANITSCHKOW und TRENDLENBURG (9) sowie von VOGT (8) ausführlich beschrieben und in ihrer Ursache aufgeklärt. Für die vorliegende



ABB. 3/1

Cardiometer- und Blutdruckkurve einer Katze (Äthernarkose). (s. ABB. 3/2).

Untersuchung sind sie deshalb wichtig, weil trotz Erhöhung der Vorhofsdrucke in den betreffenden Versuchen die Aktionsströme mit Eintritt der vollen Herzdilatation schliesslich abnahmen. Dagegen ist aus früheren Untersuchungen bekannt, dass jede Drucksteigerung der Vorhöfe zu einer Erhöhung der Aktionsstromfrequenz führt. Nur vorübergehend und noch vor Eintritt der vollen Herzwirkung des Barbiturpräparates können die druckempfindlichen Endorgane auf die Drucksteigerung mit einer Vermehrung der afferenten Impulse reagieren.

Die experimentelle Herzinsuffizienz durch Barbitursäurederivate ist somit von einer verminderten — bei entsprechender Dosierung sogar erloschenen — Erregbarkeit der Pressorezeptoren des Herzens begleitet. Die Senkung des arteriellen Blutdruckes während der Insuffizienz scheidet als Ursache für die Verringerung der Frequenz der Aktionsströme der afferenten Herznerven aus, da einerseits trotz des Druckabfalles zu Beginn der Insuffizienz die Aktionsströme noch in normalem, bzw. bei Vorhofsdrucksteigerung sogar in vermehrtem Ausmasse vorhanden sind; andererseits überdauert, wie früher ausgeführt wurde, die Abnahme der Aktionsströme die Blutdrucksenkung. Die weitgehende Unabhängigkeit des Aktionsstrombildes der afferenten Herznerven vom

arteriellen Blutdruck, die schon von AMANN und SCHÄFER festgestellt wurde, und auch aus unseren vorhergehenden Angaben ersichtlich ist, wird noch durch Versuche bestätigt, in denen Katzen Azetylcholin in verschiedenen Dosen injiziert wurde: niedrige Dosen von ACH, die nur den Blutdruck senken, ohne Herzvolumen und Vorhofsdrucke zu ändern verursachten in keinem der Versuche eine sichere Änderung

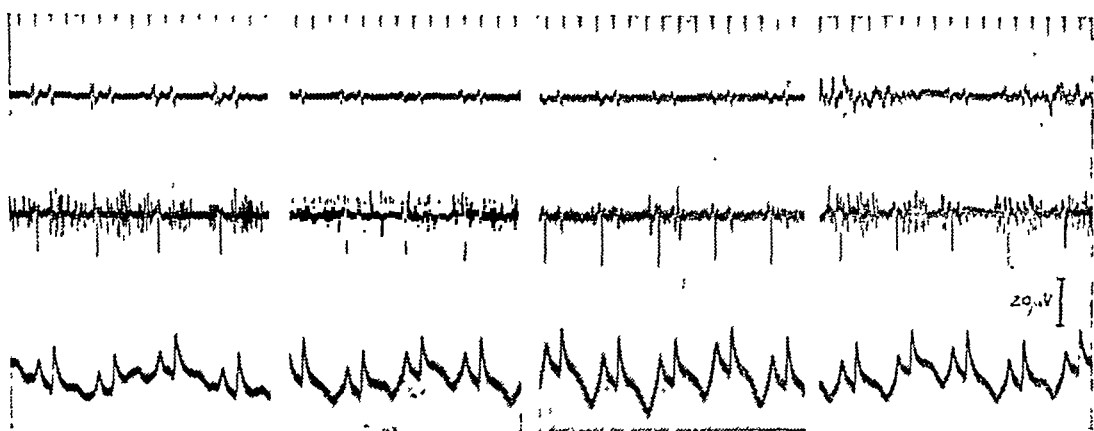


ABB. 3/2

Aktionsstromoskillogramme der Nn. card. sup. dext. (obere Kurve) der Nn. card. infer. dext. (mittlere Kurve) und EKG desselben Versuchstieres.

a) Zu Versuchsbeginn.

b) 15 sec. nach Injektion von 40 mg/kg Evipan in die V. fem. dext.

c) 45 sec. nach Injektion von 40 mg/kg Evipan in die V. fem. dext.

d) 12 min. nach Injektion von 40 mg/kg Evipan in die V. fem. dext.

Die Aktionsströme der Herznerven wurden synchron mit den markierten Punkten der Russkurve aufgenommen; bei ↑ steht das Kymo 8 min.

(Im Oszillogramm der oberen Herznerven sind nur Reibungspotentiale ersichtlich; in der Ableitung von den unteren Herznerven treten in regelmäßiger Folge monophasische Zacken nach abwärts auf: sie entsprechen vermutl. dem P des EKG; es wurde vom undurchschnittenen Nerven abgeleitet).

der Aktionstromfrequenz. Höhere Dosen von ACH hingegen (50-100 μ g) veränderten das Aktionsstrombild je nachdem, ob die Vorhofsdrucke anstiegen oder durch Ueberwiegen der peripheren gefässerweiternden Wirkung abnahmen, im Sinne der Vermehrung bzw. Verringerung der Zahl der Entladungen während einer Herzaktion. Mit Sicherheit wird die verminderte Erregbarkeit der Pressorezeptoren während der experimentellen Herzinsuffizienz durch drei Versuche bestätigt, in denen bei Hunden während einer akuten Insuffizienz die Arteria Pulmonalis kurzdauernd abgeklemmt wurde; die am nicht geschädigten Versuchstier in solchen Fällen zu beobachtende starke Vermehrung der Aktionsströme in den sensiblen Herznerven der rechten Seite infolge Vorhofsdrucksteigerung blieb aus und war erst nach Abklingen der Insuffizienz wieder in der üblichen Weise zu registrieren.

Injektion von Strophanthin (0,05-0,1 mg) in die obere Hohlvene während der maximalen Herzdilatation durch Barbitursäurederivate bewirkt gleichlaufend mit der gegenüber den Vergleichsversuchen ohne Strophanthin beschleunigten Rückkehr zum anfänglichen Herzvolumen auch eine raschere Wiederherstellung des Aktionsstrombildes, das zu Versuchsbeginn registriert wurde. Ein deutlicher Unterschied gegenüber den Versuchen, in denen die spontane Erholung nach der künstlichen Herzinsuffizienz abgewartet wurde, besteht in der zeitlichen Beziehung zum Wiederanstieg des arteriellen Blutdruckes: die Aktionsströme in den afferenten Herznerven waren in allen Versuchen nach Strophanthininjektion bereits wieder in der für das betreffende Nervenpräparat festgestellten Ausgangsfrequenz abzuleiten, wenn der Blutdruck noch stark gesenkt war, in drei Versuchen war der arterielle Druck von seinem tiefsten Niveau zum Zeitpunkt der vollen Insuffizienz überhaupt noch nicht angestiegen. Dazu steht die früher beschriebene zeitliche Zuordnung zwischen Erholung des Blutdruckes und des Aktionsstrombildes bei unbeeinflusstem Ablauf der experimentellen Insuffizienz im Gegensatz. Diese Versuche zeigen wieder, dass die beobachteten Veränderungen der Aktionsströme nicht durch Erniedrigung des arteriellen Druckes verursacht sein können; bemerkenswert ist, dass in Versuchen, in denen nach wiederholter Injektion von Barbitursäurepräparaten die Vorhofsdrucke um 10-20 cm H₂O bei einer neuerlichen derartigen Insuffizienz anstiegen, nach Strophanthin die verminderten Aktionsströme bei gleichzeitiger Senkung der Vorhofsdrucke auf die Normalwerte wiederkehren. Es besteht also ein gegensätzliches Verhalten zur Auswirkung der Vorhofsdruckänderung beim ungeschädigten Herzen: bei diesem bewirkt jede Senkung des Vorhofsdruckes eine deutliche Abnahme der Aktionsstromfrequenz.

Die bisher mitgeteilten Versuchsergebnisse sind an allen Aesten der sensiblen Herznerven beider Seiten nachzuweisen und gelten auch für jene Nerven, deren Aktionsströme in Einzelfaserpräparaten keine Zuordnung zu Aenderungen des Herzzinnendruckes während der Herzaktion erkennen lassen. Es ist möglich, dass die sensiblen Endorgane dieser Nerven Chemorezeptoren sind; darnach sind die in der Anoxämie beobachteten Dauerentladungen (10, 5) in den afferenten Herznerven solchen Rezeptoren zuzuordnen.

Bei gleichzeitiger Ableitung der Aktionsströme von zwei verschiedenen afferenten Herznerven derselben Seite oder bei gleichzeitigem Abgriff der Aktionspotentiale von rechten und linken sensiblen Herznerven treten die beschriebenen Veränderungen der Aktionsströme annähernd gleichzeitig ein.

BESPRECHUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE

Die Versuche zeigen, dass durch Barbitursäurederivate in den angewandten Dosen eine Lähmung der sensiblen Endorgane des Herzens verursacht wird, die sich als eine Verringerung der Zahl der afferenten Impulse in den Nn. cardialis inferiores äussert; die Lähmung der Rezeptoren ist spontan reversibel; die Wiederherstellung ihrer Funktion kann durch Strophanthin ebenso wie der Rückgang der Herzdilatation beschleunigt werden.

Die Möglichkeit, experimentell eine reversible Lähmung der im Herzen gelegenen sensiblen Endorgane zu erzeugen und ihren zeitlichen Verlauf durch das Oszillogramm der sensiblen Herznerven zu verfolgen, gibt Anlass, die physiologische Funktion dieser Rezeptoren erneut zu untersuchen; ausserdem erhebt sich die Frage, ob die Lähmung dieser Endorgane für die Entstehung der Herzinsuffizienz von ursächlicher Bedeutung sein kann.

Gegen einen solchen Zusammenhang spricht die Tatsache, dass am innervierten wie am denervierten Herzen in derselben Weise die experimentelle Herzinsuffizienz durch Barbitursäurederivate ausgelöst wird; Durchschneiden beider Halsvagi ebenso wie Unterbrechung aller afferenter Herznerven in unmittelbarer Nähe des Herzens, hat keinerlei Einfluss auf die Herzwirkung der Barbitursäurepräparate. Offenbar ist die reversible Lähmung der sensiblen Endorgane im Herzen nur eine Begleiterscheinung der bekannten Stoffwechselschädigung des Herzmuskels durch die angewandten Stoffe und die Strophanthinwirkung auf diese Rezeptoren eine Folge der Verbesserung des geschädigten Stoffwechsels (11).

Inwieweit die ungestörte Funktion der afferenten Herznerven und ihres Rezeptorenapparates für die Herztätigkeit von Bedeutung ist, ist nach den darüber vorliegenden Versuchsergebnissen noch nicht vollständig geklärt: Nach JARISCH verläuft die afferente Bahn für den *Jarisch-Bezold Reflex* über die Nn. cardiales inf.; die Bedeutung dieser Nerven für den *Bainbridge Reflex* ist weniger sicher, da TIITSO (12) auch an denervierten Herzen Frequenzsteigerung nach Erhöhung des Druckes im rechten Vorhof nachweisen konnte. Für die andauernde tonische Innervation des Herzens auf reflektorischem Wege, die von HENZE (13) an Kaninchen durch reizlose Ausschaltung der Nn. vagi am Hals nachgewiesen wurde, müssen als afferente Bahn die Nn. card. inf. angenommen werden.

Die Lähmung der Pressorezeptoren durch Barbitursäurederivate

verursacht sicherlich eine Störung dieses Reflexonus, ist jedoch für die experimentelle Herzinsuffizienz selbst nicht von ursächlicher Bedeutung. Hingegen wäre denkbar, dass ähnliche Funktionsstörungen der cardialen Pressorezeptoren bei den einzelnen Formen der klinischen Herzdilatation infolge Schädigung des Myocards eintreten.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Barbitursäurederivate (Evipan, Eunarcon, Pernocton) werden die sensiblen Endorgane des Herzens reversibel gelähmt, wodurch eine Abnahme der Frequenz der afferenten Impulse in den Nn. card. inf. beider Seiten bewirkt wird. Durch Strophanthin wird die Erholung der geschädigten Endorgane beschleunigt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. — E. D. ADRIAN. *J. Physiol.*, 1933, 79, 332.
2. — A. AMANN u. H. SCHÄFER. *Pflüger Archiv*, 1943, 246, 757.
3. — A. JARISCH u. Y. ZOTTERMANN. *Acta Physiol. Scand.*, 16-31, 1948.
4. — F. KAINDL, K. POLZER, W. SCHÖBER. *Zeitschrift f. Nervenheilkunde*, im Druck.
 F. KAINDL, MARKO, K. POLZER, W. SCHÖBER. *Wr. Zt. Nervenheilkunde*, 1948, 2, 69.
 F. KAINDL, K. POLZER, W. SCHÖBER. *Arch. internat. Pharmacodyn.*, 1948, 77, 256.
5. — F. KAINDL, K. POLZER, G. WERNER. *Arch. internat. Pharmacodyn.*, 1949, im Druck.
6. — GOORMAGHTIGH u. R. PANNIER. *Arch. de Biol.*, 1939, 50, 455.
7. — A. JARISCH, C. HENZE. *Arch. exper. Pathol. u. Pharm.*, 1937, 187, 706.
8. — M. VOGT. *Arch. exper. Pathol. u. Pharm.*, 1930, 152, 341.
9. — S. W. ANITSCHKOW, P. TRENDELENBURG. *Dtsch. med. Wschr.*, 1928, 54, 1672.
10. — H. SCHÄFER. *Pflüger Arch.*, 1948, 248, 527.
11. — A. RÜHL. *Kli. Wo.*, 1934, 1529.
 KL. GOLLWITZER-MEIER. *Pflüger Arch.*, 1941, 245, 385.
 G. WERNER. *Arch. internat. Pharmacodyn.*, 1949, im Druck.
12. — M. TIITSO. *Pflüger Arch.*, 1937, 238, 738; *Ibidem*, 1939, 242, 685.
13. — C. HENZE. *Arch. internat. Pharmacodyn.*, 1936, 55, 44.

INSTITUT DE PHYSIOLOGIE DE L'UNIVERSITÉ DE MONTEVIDEO
DIR. : PROF. DR. D. BENNATI

SUR LA PHARMACOLOGIE DU DIMÉTHYLCARBAMATE D'HYDROXY - PHÉNYL - BENZYL - TRIMÉTHYLAMMONIUM (Nu-683)

II. Actions du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène vasopressive des chémo-récepteurs du glomus carotidien à l'acétylcholine (*) (*With Summary*)

PAR

H. MAZZELLA ET E. MIGLIARO

(*Travail reçu le 12-2-1949*).

CALDEYRO et GARCIA AUSTT (1) ont montré que l'inactivation des cholinestérases par le Nu-683 intensifie les réflexes cardio-inhibiteurs pneumogastriques déclenchés par l'excitation des chémo-récepteurs du glomus carotidien par l'acétylcholine.

Nous avons examiné l'influence du Nu-683 sur l'action stimulante des chémo-récepteurs du glomus carotidien par l'acétylcholine, en ce qui concerne les réflexes vasopresseurs que cette stimulation provoque.

Chez le chien, on sectionne les nerfs vagues-aortiques cervicaux, on injecte de l'atropine afin d'exclure les réactions vagues cardiaques, on curarise l'animal afin d'exclure les réactions respiratoires et on lie, au niveau du sinus carotidien, toutes les branches artérielles, à l'exception de celles qui irriguent le glomus carotidien. On enregistre la pression artérielle à l'artère fémorale.

L'injection (\uparrow_1 , fig. 1) dans la carotide commune, par le bout carotidien de l'artère thyroïdienne ligaturée du sinus carotidien préparé comme décrit plus haut, d'une faible dose d'acétylcholine ne déclenche

(*) Communication préliminaire à la séance du 25 nov., 1948, de la Société de Biologie de Montevideo.

pas de réactions vasopressives réflexes et ne stimule donc pas les chémorécepteurs du glomus carotidien.

On administre ensuite (\uparrow_2 , fig. 1), en injection intraveineuse, une dose de Nu-683.

Quinze minutes après l'injection de Nu-683, on injecte à nouveau dans la carotide commune, la même dose d'acétylcholine (\uparrow_3 , fig. 1) et on observe, cette fois, une élévation très marquée de la pression artérielle, due à la stimulation réflexe des centres vasomoteurs par l'excitation des chémorécepteurs du glomus carotidien par l'acétylcholine.

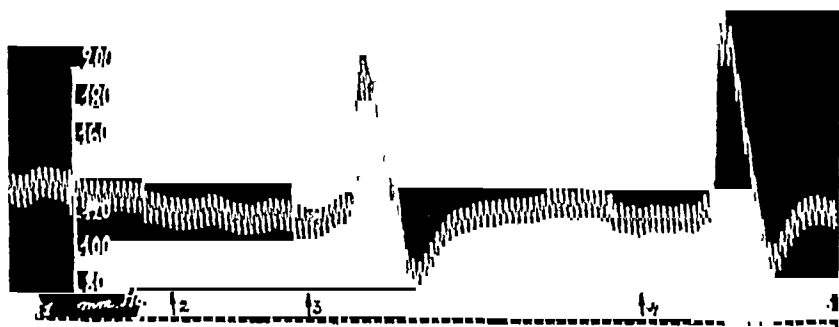


FIG. 1

Chien, 22 kg, anesthésié à la morphine-chloralosane, atropiné, curarisé et vagotomisé.

Les sinus carotidiens sont préparés suivant la technique décrite.

1 : injection dans la carotide commune (chémo-récepteurs du glomus carotidien) de 1 cc. acétylcholine 1/20.000. Pas de réactions vasomotrices réflexes.

2 : injection intraveineuse de 8 mg Nu-683.

3 : 15 min. après injection de Nu-683, injection intra-carotidienne (chémo-récepteurs) de 1 cc. acétylcholine 1/20.000. Réaction vasopressive réflexe très marquée.

4 : même injection d'acétylcholine qu'en 3 ; même réaction vasopressive réflexe.

CONCLUSIONS

Ces faits expérimentaux démontrent que le Nu-683, administré à dose qui inactive sélectivement la cholinestérase sérique (pseudo-cholinestérase), sensibilise les chémorécepteurs du glomus carotidien à l'acétylcholine. Cette sensibilisation intensifie notablement les réflexes vaso-presseurs déclenchés par l'excitation acétylcholinique des chémorécepteurs du glomus carotidien.

SUMMARY

Injection of dimethylcarbamate of (2-hydroxy-5-phenylbenzyl) trimethyl-ammonium (Nu-683) in doses inducing selective inactivation of pseudo-cholinesterase, sensitises the chemo-receptors of the carotid body to acetylcholine and thus increases the vaso-pressor reflex responses due to chemoceptive stimulation by acetylcholine.

BIBLIOGRAPHIE

CALDEYRO, R. et MAZZELLA, H. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1949, sous presse.

INSTITUT DE PHYSIOLOGIE DE L'UNIVERSITÉ DE MONTEVIDEO

DIR. : PROF. DR. D. BENNATI

SUR LA PHARMACOLOGIE DU DIMÉTHYLCARBAMATE D'HYDROXY - PHÉNYL - BENZYL - TRIMÉTHYLAMMONIUM (Nu-683)

III. Action du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène respiratoire des chémo-récepteurs du glomus carotidien (*) (With Summary)

PAR

A. FERNANDEZ

(Travail reçu le 15-2-1949).

CALDEYRO et GARCIA AUSTT (1) et MAZZELLA et MIGLIARO (2) ont montré que le Nu-683 intensifie les réflexes cardio-inhibiteurs et vasopresseurs déclenchés par l'excitation des chémo-récepteurs du glomus carotidien par l'acétylcholine.

Nous avons recherché l'influence du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène des chémo-récepteurs du glomus carotidien.

Chez le chien, on lie les branches artérielles d'un sinus carotidien à l'exception de celles qui irriguent le glomus carotidien, et on enregistre le pneumogramme.

L'injection (\uparrow_1 , FIG. 1) de sulfure de sodium dans la carotide commune (glomus carotidien) ainsi préparée, détermine une stimulation réflexe du centre respiratoire d'origine chémo-sensible.

L'injection (\uparrow_1 , FIG. 2) d'une faible dose d'acétylcholine dans la carotide commune ainsi préparée, ne détermine qu'une très faible stimulation réflexe respiratoire d'origine chémo-réceptrice.

On administre ensuite au chien, en injection intraveineuse, une dose de Nu-683 qui inactive surtout la cholinestérase sérique.

L'injection (\uparrow_2 , FIG. 1) de la même dose de sulfure de sodium dans la carotide commune (glomus carotidien) détermine la même stimulation réflexe du centre respiratoire qu'en \uparrow_1 , fig. 1.

(*) Communication à la séance du 25 nov. 1948 de la Soc. de Biol. de Montevideo.

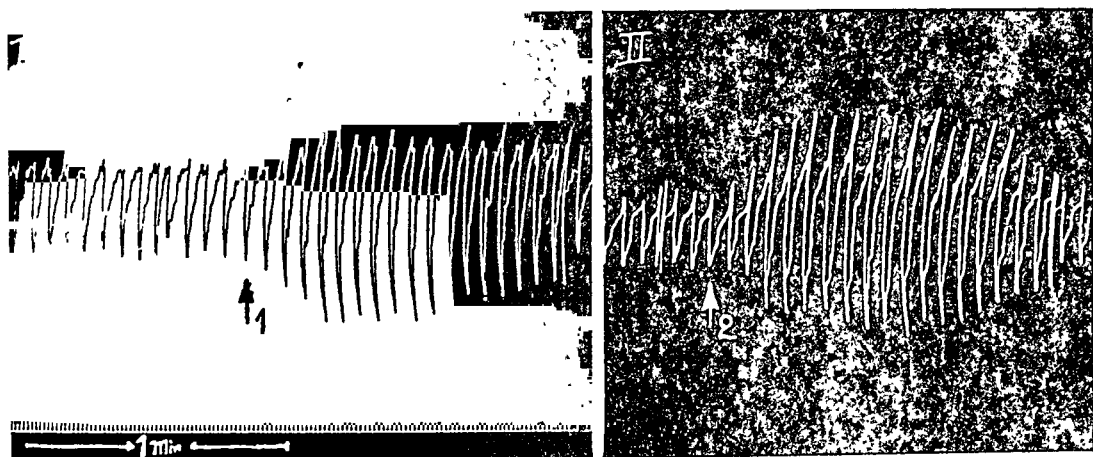


FIG. 1

Chien, 23 kg. Anesthésié à la morphine-chloralosane. Enregistrement de la respiration. Sinus carotidien préparé suivant la technique indiquée.

↑₁: injection intra-carotidienne (chémo-récepteurs du glomus carotidien) de 10 mg sulfure de sodium. Hyperpnée réflexe.

Entre I et II : injection intra-veineuse de 0.3 mg/kg Nu-683.

↑₂: 10 min. après l'injection Nu-683, même injection intra-carotidienne de sulfure de sodium; même hyperpnée réflexe.

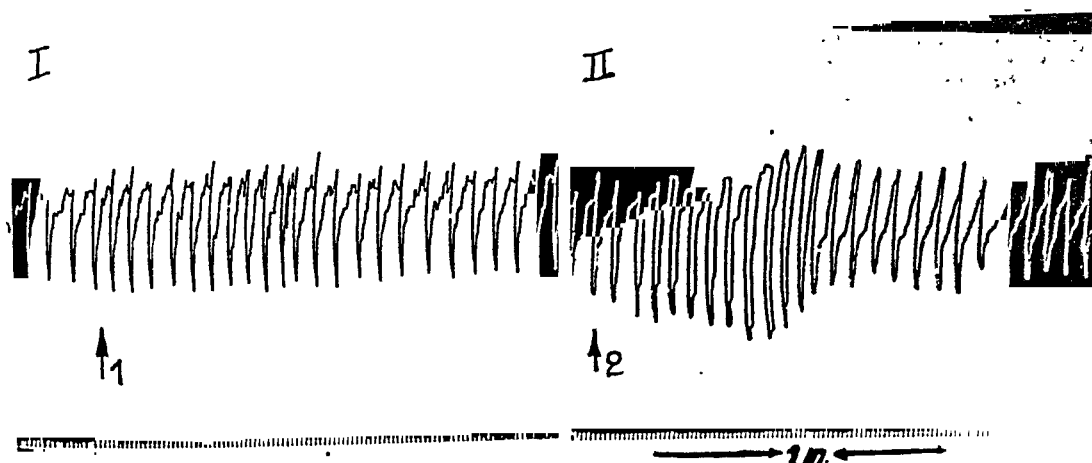


FIG. 2

Chien, 22 kg, même préparation qu'en fig. 1.

↑₁: injection intra-carotidienne de 0.1 mg acétylcholine. Faible hyperpnée réflexe.

Entre I et II : injection intraveineuse de 0.3 mg/kg Nu-683.

↑₂: 15 min. après l'injection de Nu-683, même injection intra-carotidienne d'acétylcholine qu'en ↑₁; hyperpnée réflexe marquée.

L'injection (\uparrow_2 , FIG. 2) de la même dose d'acétylcholine, dans la carotide commune (glomus carotidien) qu'avant l'administration de Nu-683, déclenche cette fois une forte hyperpnée réflexe.

CONCLUSIONS

Ces faits expérimentaux démontrent que le Nu-683, injecté à des doses qui inactivent surtout la cholinestérase sérique (pseudo-cholinestérase), intensifie les réflexes respiratoires déterminés par l'excitation des chémo-récepteurs du glomus carotidien par l'acétylcholine, mais ne sensibilise pas ces chémo-récepteurs vis-à-vis de la stimulation déterminée par le sulfure de sodium.

SUMMARY

Injection of Nu-683 in doses inactivating mainly the pseudo-cholinesterase, sensitises the chemo-receptors of the carotid body to the respiratory reflex stimulating effect of acetylcholine, but not of sodium sulfide.

BIBLIOGRAPHIE

1. — CALDEYRO, R. et GARCIA AUSTT, F. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1949, sous presse.
2. — MAZZELLA, H. et MIGLIARO, E. *Ibid.*, 1949, sous presse.

INSTITUT DE PHYSIOLOGIE DE L'UNIVERSITÉ DE MONTEVIDEO
DIR. PROF. DR. D. BENNATI

SUR LA PHARMACOLOGIE DU DIMÉTHYLCARBAMATE D'HYDROXY - PHÉNYL - BENZYL - TRIMÉTHYLAMMONIUM (Nu-683)

IV. Influences du Nu-683 sur la sécrétion salivaire (*) (*With Summary*)

PAR

A. FERNANDEZ ET J. J. VINOLES

(*Travail reçu le 16-2-1949*).

Des travaux antérieurs (1, 2, 3, 4) ont mis en évidence que le Nu-683 administré à des doses qui inactivent sélectivement la cholinestérase sérique (pseudo-cholinestérase), ne détermine pas de réactions cholinergiques, tout en sensibilisant intensément différentes fonctions physiologiques (cœur, synapses parasymphatiques et sympathiques, pression artérielle, chémo-récepteurs, centre cardio-inhibiteur) à l'acétylcholine.

Nous avons examiné l'influence du Nu-683 sur la sécrétion salivaire, sur l'action stimulante de l'acétylcholine sur la sécrétion salivaire, et sur l'action sécrétoire salivaire de l'excitation de la corde du tympan.

Les expériences furent exécutées sur le chien anesthésié à la morphine-chloralosane. Des canules sont placées dans les canaux salivaires de STÉNON et de WHARTON.

On mesure la sécrétion salivaire chez l'animal normal. La corde du tympan est isolée et excitée électriquement, avec une intensité et pendant une durée déterminées.

Une dose appropriée d'acétylcholine est injectée dans le courant circulatoire de la carotide commune du côté où les canaux salivaires sont canulés, et on mesure l'action sialagogue de cette dose d'acétylcholine.

(*) Communication à la séance du 25 nov. 1948 de la Soc. de Biol. de Montevideo.

Une dose de Nu-683 qui inactive sélectivement la cholinestérase sérique, est ensuite injectée. La sécrétion salivaire est mesurée pendant 10 à 15 min. après cette injection. On répète ensuite les mêmes excitations de la corde du tympan et les mêmes injections d'acétylcholine.

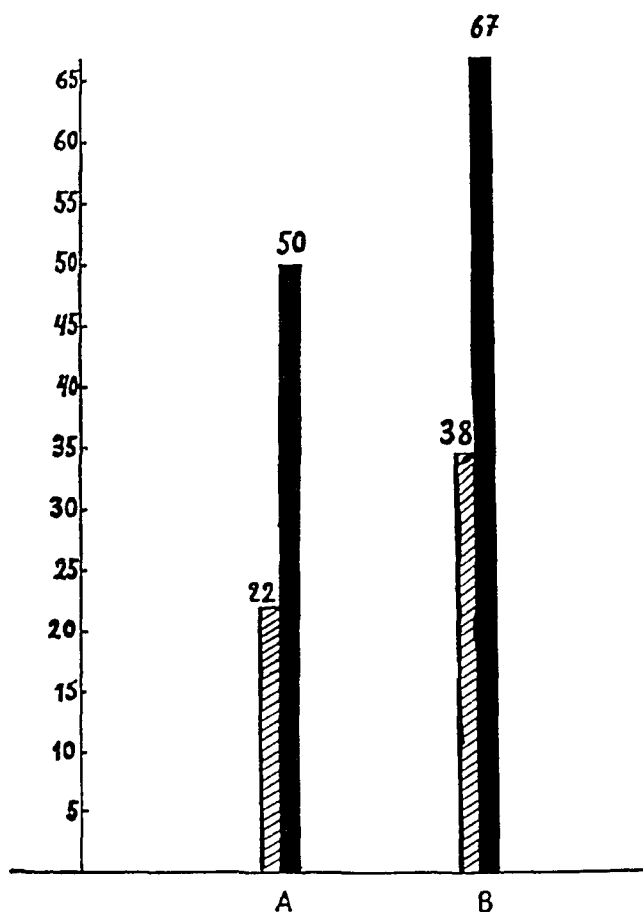


FIG. 1

Chien, 16 kg. Anesthésié à la morphine-chloralosane. Canules dans les canaux de Sténon.

En ordonnées : nombre de gouttes de salive.

A : injection d'acétylcholine dans la carotide commune gauche, avant (▨) et après (■) l'injection i.v. de 0.3 mg/kg Nu-683.

B : injection d'acétylcholine dans la carotide commune droite, avant (▨) et après (■) l'injection i.v. de 0.3 mg/kg Nu-683.

Le Nu-683 sensibilise notablement les glandes salivaires à l'action sialagogue de l'acétylcholine.

Les figures 1, 2 et 3 reproduisent les résultats des observations expérimentales.

Ces expériences montrent que le diméthylcarbamate d'hydroxyphényl-benzyl-triméthylammonium (Nu-683), administré à des doses qui inacti-

vent sélectivement la cholinestérase sérique (pseudo-cholinestérase), sensibilise notablement les glandes salivaires à l'action sialagogue de l'acétylcholine, mais ne sensibilise pas les glandes salivaires à l'action sialagogue de l'excitation de la corde du tympan.

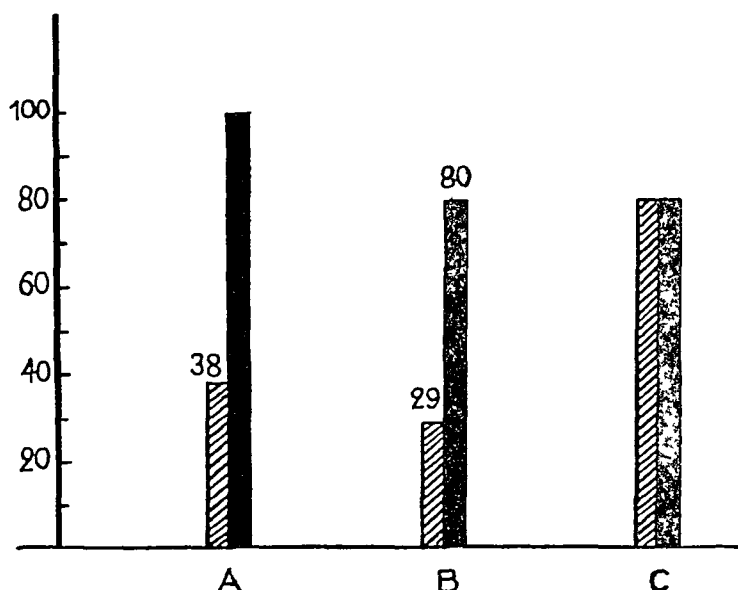


FIG. 2

Chien, 25 kg. Anesthésié à la morphine-chloralosane.

Canules dans les deux canaux des Warthon et de Sténon.

En ordonnées : nombre de gouttes de salive.

A : hypersécrétions salivaires, canaux de Warthon gauches, déterminées par l'injection d'acétylcholine, avant (▨) et après (■) l'administration de 0.3 mg/kg Nu-683.

B : idem pour les canaux de Sténon gauches.

C : hypersécrétions salivaires déterminées par l'excitation de la corde du tympan, avant (▨) et après (■) administration de 0.3 mg/kg Nu-683.

Le Nu-683 sensibilise les glandes salivaires à l'action sialagogue de l'acétylcholine, mais non à celle de l'excitation de la corde du tympan.

SUMMARY

Experiments show that injections of dimethylcarbamate of hydroxy-phenyl-benzyl-trimethylammonium (Nu-683), in doses inactivating selectively the pseudo-cholinesterase, sensitise the salivary gland secretion to acetylcholine, but not to the secretory stimulating effect of tympanic nerve stimulation.

BIBLIOGRAPHIE

1. — HEYMANS, C., VERBEKE, R. et VOTAVA, Z. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1948, 77, 486.
2. — CALDEYRO, R. et GARCIA AUSTT. *Soc. Biol. Montevideo*, 1948, 25 nov. *Ces Archives*, sous presse.
3. — MAZZELLA, H. et MIGLIARO, E. *Ibid.*, 1949, sous presse.
4. — A, FERNANDEZ. *Ibid.*, 1949, sous presse.

INSTITUT DE PHYSIOLOGIE DE L'UNIVERSITÉ DE MONTEVIDEO

DIRECTEUR : PROF. DR. D. BENNATI

**SUR LA PHARMACOLOGIE DU DIMÉTHYLCARBAMATE
D'HYDROXY - PHÉNYL - BENZYL - TRIMÉTHYLAMMONIUM
(Nu-683)**

**V. Actions du Nu-683 sur l'excitabilité du nerf vague cardiaque
et sur la sensibilité du cœur à l'acétylcholine (*)**

(With Summary)

PAR

R. CALDEYRO ET E. GARCIA AUSTT

(Travail reçu le 16-3-1949).

Des travaux antérieurs ont montré que le diméthyl-carbamate d'hydroxy-phényl-benzyl-triméthylammonium (Nu-683) possède la propriété d'inhiber sélectivement, à certaines doses, l'activité de la cholinestérase sérique (pseudo-cholinestérase). De plus fortes doses de Nu-683 inactivent également la cholinestérase globulaire et tissulaire (vraie cholinestérase).

Malgré l'inactivation sélective de la cholinestérase sérique, les symptômes dits cholinergiques font défaut, alors que la sensibilité de différentes fonctions végétatives (cœur, bronches, intestins, glandes salivaires, synapses) est notablement augmentée vis-à-vis de l'acétylcholine (1).

Nous avons montré, dans un travail antérieur (2), que le Nu-683, injecté à des doses qui inactivent sélectivement la cholinestérase sérique, ne modifie pas l'excitabilité réflexe et directe du centre cardio-inhibiteur vagal, alors que les réactions de ce même centre à l'acétylcholine, administrées en injection intraveineuse, sont notablement augmentées. Ce fait confirme la conclusion de HEYMANS, VERBEKE et VOTAVA (1), à savoir que la cholinestérase sérique joue un rôle important dans l'hydrolyse de l'acétylcholine in vivo.

(*) Communication préliminaire à la séance du 25 nov. 1948 de la Soc. de Biol. de Montevideo.

Nous avons examiné comparativement, dans un nouveau groupe d'expériences, l'influence du Nu-683 sur l'excitabilité du nerf vague cardiaque et sur la sensibilité du cœur à l'acétylcholine.

EXPÉRIENCES

Les expériences ont été effectuées chez le chien anesthésié à la morphine-chloralosane. On enregistre la fréquence cardiaque. Le bout cardiaque d'un nerf vague sectionné est placé sur une électrode impolarisable au kaolin et stimulé par un courant de décharge de condensateurs (10 mf — 40 volts), avec une fréquence et une durée constantes. Les réactions du cœur à l'excitation du nerf vague et à l'acétylcholine sont enregistrées avant et après l'injection intraveineuse d'une dose déterminée de Nu-683.

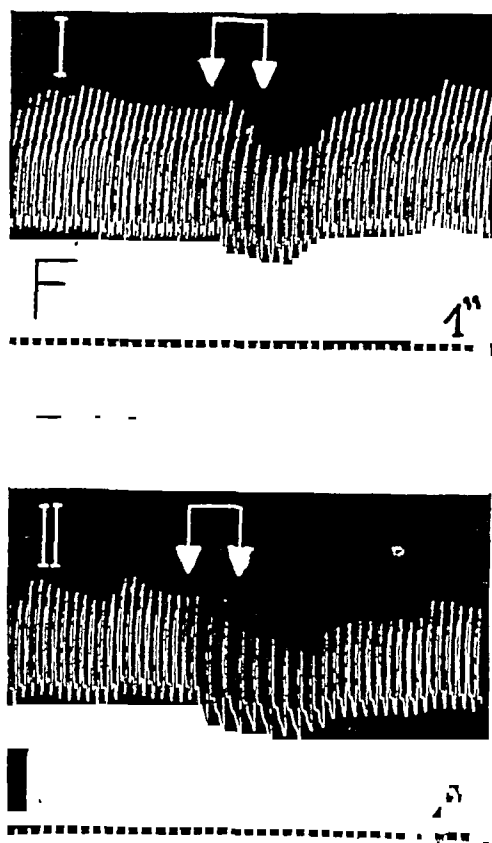


FIG. 1

Chien, 11 kg. Anesthésié à la morphine-chloralosane. Enregistrement de la fréquence cardiaque.

↑ - ↑, I : excitation du nerf vague cardiaque avec 5 stimulis.

Entre I et II : injection intraveineuse de 0.3 mg/kg de Nu-683.

↑ - ↑, II : même excitation du nerf vague qu'en I, dix minutes après l'injection de Nu-683. Sensibilisation du cœur à l'excitation du nerf vague.

Voici des expériences de cette série.

Chien, 11 kg. — Fréquence cardiaque.

La stimulation du nerf vague cardiaque (FIG. 1, I, ↑ à ↑) détermine une bradycardie; la fréquence du cœur passe de 90 à 70 battements par minute, soit une diminution de 25%. Entre I et II, fig. 1, on injecte 0.3 mg/kg de Nu-683, dose qui inactive sélectivement la cholinestérase sérique.

Dix minutes après l'injection de Nu-683, la même stimulation du nerf vague entraîne un ralentissement du cœur (FIG. 1, II, ↑ à ↑) de 85 à 48 battements par minute,

soit une diminution de 41 %. Le cœur est donc sensibilisé à l'excitation du nerf vague.

L'injection intraveineuse d'acétylcholine, avant l'administration de Nu-683, à des doses de 25 gammas (FIG. 2, I, ↑), de 200 gammas (FIG. 2, II, ↑) et de 300 gammas (FIG. 2, III, ↑) provoque de la bradycardie.

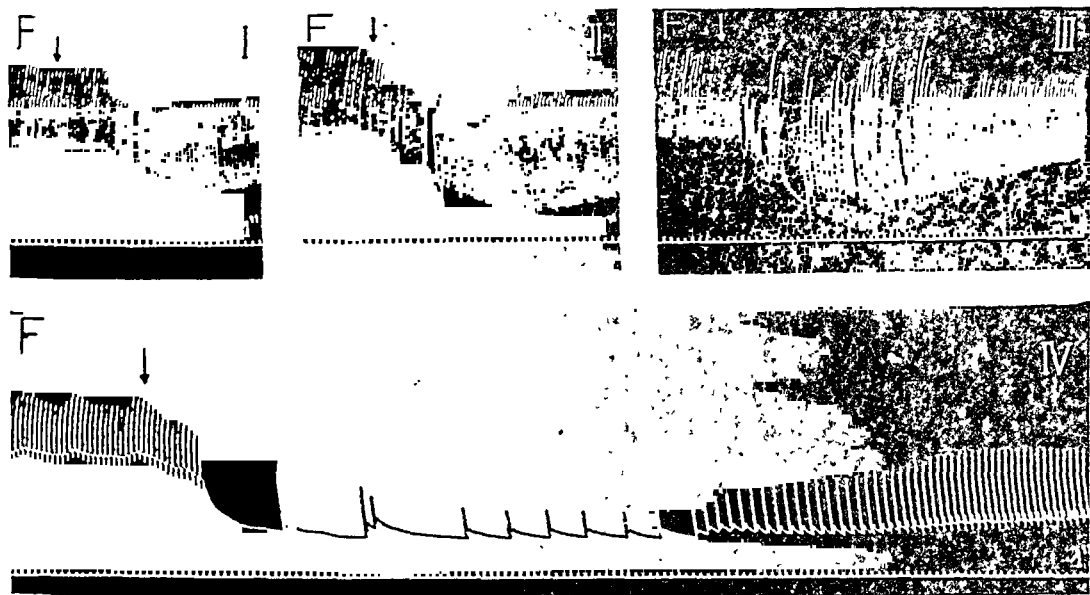


FIG. 2

Même chien que fig. 1.

↑, I : injection intraveineuse de 25 gammas acétylcholine.

↑, II : injection i.v. de 200 gammas acétylcholine.

↑, III : injection i.v. de 300 gammas acétylcholine.

Entre III et V : injection i.v. de 0.3 mg/kg de Nu-683.

↑, IV : injection i.v. de 25 gammas acétylcholine; forte sensibilisation du cœur à l'acétylcholine.

L'injection de 25 gammas d'acétylcholine (FIG. 2, IV, ↑), après l'administration de 0.3 mg/kg de Nu-683, déclenche une bradycardie très intense et prolongée, beaucoup plus intense qu'avant l'injection de Nu-683. Cette bradycardie dépasse de douze fois en intensité celle déterminée, par la même dose d'acétylcholine, avant l'administration du Nu-683.

Chien, 12 kg. — Fréquence cardiaque.

La stimulation du nerf vague cardiaque avec 5 stimuli (FIG. 3, I, ↑ à ↑) et 15 stimuli (FIG. 3, II, ↑ à ↑) provoque une bradycardie.

On injecte, entre II et III, fig. 3, 0.3 mg/kg de Nu-683. Dix minutes après l'injection i.v., on applique les mêmes stimuli au nerf vague

(FIG. 3, III, \uparrow à \uparrow ; IV, \uparrow à \uparrow) qu'en I et II, fig. 3. La bradycardie est respectivement 1,7 et 1,3 plus forte en III et IV, qu'en I et II.

Entre IV et V, fig. 3, on injecte une nouvelle dose de 0.3 mg/kg de Nu-683. Dix minutes après cette injection, les mêmes stimuli du nerf vague (FIG. 3, V, \uparrow à \uparrow ; VI, \uparrow à \uparrow) entraînent respectivement une bradycardie 1,2 et 1,1 plus marquée qu'en III et IV.

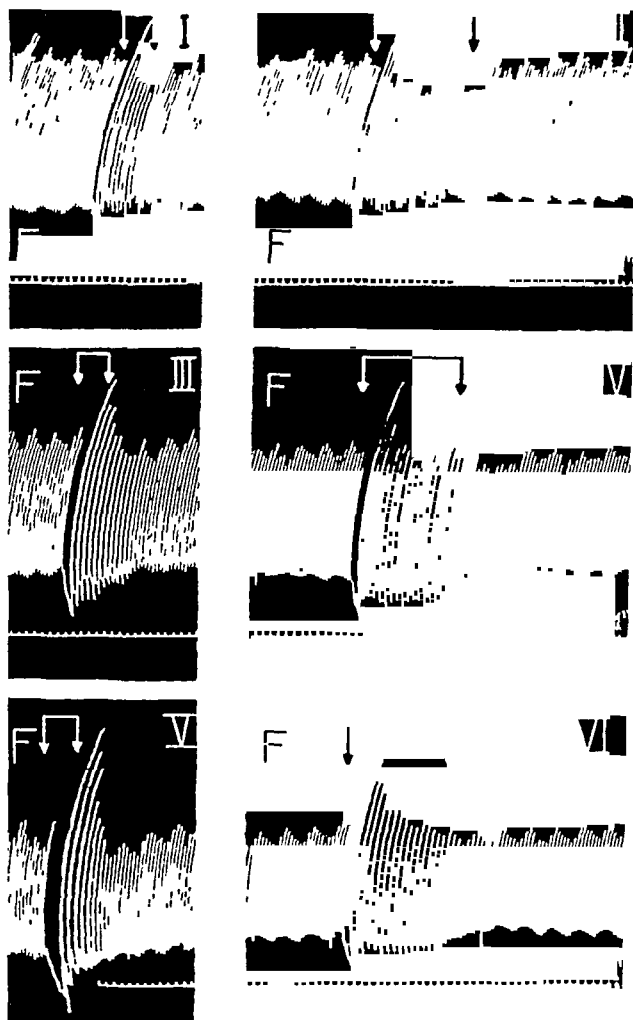


FIG. 3

Chien, 12 kg. Anesthésié à la morphine-chloralosane. Enregistrement de la fréquence cardiaque.

\uparrow - \uparrow , I : excitation du n. vague, avec 5 stimuli.

\uparrow - \uparrow , II : excitation du n. vague, avec 15 stimuli.

Entre II et III : injection i.v. de 0.3 mg/kg de Nu-683.

\uparrow - \uparrow , III : excitation du n. vague, avec 5 stimuli.

\uparrow - \uparrow , IV : excitation du n. vague, avec 15 stimuli.

Entre IV et V : injection i.v. de 0.3 mg/kg de Nu-683.

\uparrow - \uparrow , V : excitation du n. vague, avec 5 stimuli.

\uparrow - \uparrow , VI : excitation du n. vague, avec 15 stimuli.

Sensibilisation du cœur, par le Nu-683, à l'excitation du n. vague.

Si on injecte (FIG. 4, I, ↑) 10 gammas d'acétylcholine, avant l'administration de Nu-683, la bradycardie est pratiquement nulle. L'injection i.v. de 10 gammas d'acétylcholine (FIG. 4, II, ↑), dix minutes après l'administration de 0.3 mg/kg de Nu-683, ralentit le rythme cardiaque de 14 %.

Entre II et III, fig. 4, on injecte une nouvelle dose de 0.3 mg/kg de Nu-683.

Dix minutes après cette injection, la même dose de 10 gammas d'acétylcholine déclenche une intense bradycardie, qui est 5,3 fois plus prononcée qu'en II, fig. 4.

CONCLUSIONS

Les expériences, effectuées chez le chien, montrent que le diméthyl-carbamate d'hydroxy-phényl-benzyl-triméthylammonium (Nu-683) peut sensibiliser légèrement le cœur à l'action inhibitrice du nerf pneumogastrique, tout en sensibilisant très notablement le cœur à l'action inhibitrice de l'acétylcholine.

SUMMARY

Experiments performed on dogs show that dimethylcarbamate of hydroxy-phenyl-benzyl-trimethylammonium (Nu-683) may sensitise slightly the heart to the inhibitory influence of vagal stimulation, but sensitises very markedly the heart to the inhibitory influence of acetylcholine.



FIG. 4

Même chien que fig. 3.

↑, I : injection i.v. de 10 gammas acétylcholine.
Entre I et II : injection i.v. de 0.3 mg/kg de Nu-683.
↑, II : injection i.v. de 10 gammas acétylcholine.
Entre II et III : injection i.v. de 0.3 mg/kg de Nu-683.
↑, III : injection i.v. de 10 gammas acétylcholine.
Le Nu-683 sensibilise notablement le cœur à l'acétylcholine.

BIBLIOGRAPHIE

1. — C. HEYMANS, R. VERBEKE et Z. VOTAVA. Ces Arch., 1948, 77, 486.
2. — R. CALDEYRO et E. GARCIA AUSTT. Ces Arch., 1949, sous presse.

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE JASSY. DIRECTEUR : PROF. DR. D. BRĂNIȘTEANU

ACTION DE L'ASSOCIATION SULFATHIAZOL-LUMINAL SUR LE CŒUR DE GRENOUILLE

PAR

D. BRĂNIȘTEANU ET GH. GH. POPOVICI

(Travail reçu le 28-1-1949).

Parmi les incompatibilités des sulfamides, figure aussi leur association avec les barbituriques.

Les données tant cliniques qu'expérimentales, prouvant le danger de cette association, sont assez peu nombreuses.

Ainsi ADRIANI (1) expérimentant sur des rats, conclut que des doses subanesthésiques de barbituriques, peuvent, sous l'influence de la sulfanilamide (1162 F), devenir, dans certains cas, mortelles. Ceci arrive, spécialement lorsqu'il s'agit d'acides barbituriques contenant une plus forte quantité de soufre.

JAMBON et CHAPTAL (2) relatent un cas de mort chez un épileptique, auquel pendant un traitement au gardénal, on avait administré 3 gr. de Dagénan.

Pour VELASQUEZ (3), l'association sulfamides-barbituriques peut produire, chez l'homme, certains phénomènes entraînant même la mort.

En partant de ces données, ainsi que du fait d'avoir repris ces derniers temps l'étude de l'action des barbituriques sur le cœur (4) et celle des sulfamides sur l'appareil cardio-vasculaire (5), nous nous sommes proposés d'étudier expérimentalement l'action de cette association sur le cœur.

Dans la note présente, nous donnons les résultats obtenus après administration concomitante du Cibazol (*p*-amino-benzoyl-sulfamido-2-thiazol), sa forme injectable, et du Luminal sodique (le sel sodique de l'acide phényl-éthyl-barbiturique) sur le cœur de grenouille.

La technique employée a été celle de la détermination du débit cardiaque par irrigation du cœur in situ (6). Après avoir déterminé le débit cardiaque normal, on perfusait le cœur avec du Cibazol + Luminal

en diverses concentrations. Le Cibazol a été employé en concentrations de 0,01 % (dose indifférente pour le cœur de grenouille), 0,025 % et 0,05 % (doses excitantes pour le cœur), 0,1 % et 0,2 % (doses dépressives pour le cœur) et le Luminal en concentrations de 0,01 % (dose indifférente pour le cœur) et 0,02 % (dose dépressive). Ces concentrations susmentionnées ont été établies en nous basant sur nos recherches antérieures (4, 5).

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau présent :

Concentration de l'association Luminal + Cibazol	Effet sur le débit cardiaque	Troubles de conductibilité
Luminal 0,01 % (dose indif.) + Cibazol 0,01 % (dose indif.)	Diminue de 23 %-25 %	absents
Luminal 0,01 % + Cibazol 0,025 % (dose excit.)	Diminue de 17 %-23 %	absents
Luminal 0,01 % + Cibazol 0,05 % (dose excit.)	Diminue de 20 %-23 %	absents
Luminal 0,01 % + Cibazol 0,1 % (dose dépres.)	Diminue de 9 %-20 %	présents
Luminal 0,01 % + Cibazol 0,2 % (dose dépres.)	Diminue de 13 %-15 %	présents
Luminal 0,02 % (dose dépres.) + Cibazol 0,01 %	Diminue de 25 %-29 %	absents
Luminal 0,02 % + Cibazol 0,05 %	Diminue de 23 %-25 %	absents
Luminal 0,02 % + Cibazol 0,1 %	Diminue de 20 %-23 %	présents

De l'examen de ces résultats, il ressort, premièrement, que par perfusion d'un mélange de Cibazol et Luminal, en concentrations telles que séparément ni l'un ni l'autre n'aurait eu aucune influence sur le cœur, on a obtenu une diminution net du débit cardiaque. Par perfusion avec un mélange de Luminal en dose indifférente et de Cibazol en dose

excitante ou dépressive, l'action obtenue est toujours dépressive. L'association de Luminal en concentration dépressive et de Cibazol, en concentration soit indifférente, soit excitante ou dépressive, produit toujours une diminution du débit cardiaque.

En second lieu, les troubles de conductibilité que nous avons observés avec des doses dépressives de Cibazol, apparaissent, de même, après emploi de l'association Luminal-Cibazol, mais toujours, dans les cas seulement, où le Cibazol se trouve en concentration dépressive. Dans les mélanges, où le Cibazol se trouve en concentration excitante ou indifférente, quoiqu'en association avec le Luminal, l'effet sur le cœur demeure dépressif, les troubles de conductibilité n'apparaissent pourtant pas.

Le troisième fait observé, est la disparition des phénomènes dépressifs produits sur le cœur par cette association, immédiatement après lavage à la solution Ringer. Ceci plaiderait pour l'admission, dans l'action du mélange Luminal-Cibazol, d'un phénomène d'adsorption.

En quatrième lieu, il résulte qu'on ne saurait établir une relation entre les concentrations des substances employées et l'intensité de l'effet produit.

De tous ces faits, celui qui nous paraît être le plus important est justement l'effet nettement dépressif obtenu avec le mélange de Luminal et Cibazol en concentrations indifférentes. On sait que dans la thérapeutique usuelle, tant avec le Luminal qu'avec le Cibazol, avec des doses couramment employées, on n'observe aucune modification des fonctions cardiaques. Nous basant pourtant sur les recherches que nous venons d'exposer, nous pourrions supposer que l'administration concomitante de Cibazol et de Luminal, qui administrés séparément ne montrent aucune influence sur le cœur, pourrait tout de même manifester une action cardiaque novice. Et cette action novice deviendrait encore plus évidente dans les cas où le cœur, sur lequel l'action agit, serait plus ou moins lésé.

CONCLUSIONS

Recherchant expérimentalement sur le cœur de grenouille, par détermination du débit cardiaque, en irriguant le cœur in situ, l'action de l'association Luminal sodique (sel sodique de l'acide phényl-éthyl-barbiturique) et Cibazol (*p*.-amino-benzoyl-sulfamido-2-thiazol), la forme injectable, nous avons constaté ce qui suit :

1) Quelles que soient les doses employées, cette association produit toujours un effet dépressif sur le cœur.

2) L'effet dépressif apparaît même après emploi des doses de Cibazol et Luminal qui administrées séparément n'auraient aucune action sur le cœur.

3) Les troubles de conductibilité, observés avec des doses dépressives de Cibazol, apparaissent aussi après emploi de Luminal-Cibazol. Ceci n'a lieu que dans les cas où le Cibazol de l'association est utilisé en concentration dépressive. Quant à la concentration du Luminal, elle semble n'avoir aucune influence dans l'apparition de ces troubles.

4) Les effets nocifs produits par l'association Cibazol-Luminal, sont réversibles et paraissent être dus à un phénomène d'adsorption.

BIBLIOGRAPHIE

1. — ADRIANI, J. *J. Laborat. a Clin. Med.*, 1939, 24, 1066.
2. — JAMBON, M. et CHAPTAL, L. *Montpellier méd.*, 1941, 19-20, 438.
3. — VELASQUEZ. Cité d'après Pellerat. *J. médecine de Lyon*, 1946, 626, 111.
4. — BRĂNIȘTEANU, D. et POPOVICI, GH. GH. Voir ces Archives.
5. — BRĂNIȘTEANU, D. et POPOVICI, GH. GH. Voir ces Archives.
6. — BÜLBRING, E. *Arch. f. exp. Path. und Pharmakol.*, 1930, 152, 257.

AUS DER PHARMAKOLOGISCHEN ANSTALT DER UNIVERSITÄT BASEL

UEBER KURZ- UND NEBENSCHLÜSSE
DES LUNGENKREISLAUFES

VON

ALBERT HÜRLIMANN

(Eingegangen am 10-2-1949).

Unter Kurz- und Nebenschlüssen der Lunge wollen wir im folgenden generell Gefäßverbindungen verstehen, in denen das Blut von der arteriellen auf die venöse Seite gelangen kann, ohne das normale alveoläre Kapillarsystem der Lunge zu passieren. Als solche kommen in erster Linie in Betracht die sog. echten arteriovenösen Anastomosen im Sinne von CLARA (1939), d.h. Verbindungen, die sich durch ganz besondere histologische Merkmale (HOYER, 1876; GROSSER, 1902; VASTARINI-CRESI, 1903; SCHUMACHER, 1934; WATZKA, 1936; MASSON, 1937; SPANNER, 1938; CLARA, 1939) und durch vollständige Verschlussfähigkeit auszeichnen.

Solche arteriovenöse Anastomosen sind in der menschlichen Lunge von HAYEK (1943) beschrieben worden. Nach ihm sollen sie folgenden anatomisch-histologischen Aufbau zeigen: Aus Aesten der Art. pulmonalis entspringen muskelstarke, dickwandige Gefässe, sog. Sperrarterien. Diese sind wegen der besonderen Anordnung ihrer Ring- und Längsmuskulatur vollkommen verschlussfähig (HAYEK, 1940). In ihrer Wand weisen sie mehrere wie ausgestanzte Oeffnungen auf, die unvermittelt in dünnwandige, weite Venen überführen. Die Oeffnungen stellen somit direkte Verbindung zwischen arteriellem und venösem Gefäßsystem dar. Ihre Durchmesser betragen ungefähr $40\ \mu$. Besondere Merkmale, wie z.B. Sphinkteren, fehlen. Die anschliessenden Venen gehören teils zum Gebiet der Pulmonalvenen, teils zum bronchialen Venennetz, welches sein Blut zur Hauptsache in die Pulmonalvenen führt. HAYEK (1940) hat an zahlreichen Pulmonalisästen Sperrarterien gefunden. Es gibt daneben auch solche, die die Pulmonalarterien mit den Bronchialarterien verbinden (HAYEK, 1943).

Ausser dem bisher beschriebenen Kurzschluss des Lungenkreislaufes durch die echten arteriovenösen Anastomosen besteht noch eine weitere Möglichkeit, den Lungenkreislauf zu umgehen und zwar durch das sog. Riesenkapillarnetz der Pleura (HAYEK, 1943). Dieses entsteht aus kleinen Aesten der Art. pulmonalis, die zur Pleura ziehen und dort in ein weitmaschiges Gefässnetz übergehen, dessen Kapillaren etwa 20-50 μ weit sind. Besondere Sperreinrichtungen fehlen. Aus dem Riesenkapillarnetz fliesst das Blut in den Pleuralvenen zur V. pulmonalis und umgeht damit den regulären Kapillarkreislauf der Lungen.

Funktionell ist über die Bedeutung der Kurz- und Nebenschlüsse der Lunge fast nichts bekannt. HAYEK (1943) vermutet auf Grund seiner anatomischen Untersuchungen, dass bei Offensein aller Kurz- und Nebenschlüsse des Lungenkreislaufes eine Blutmenge von mindestens $1/5$ der Gesamtblutmenge durch diese strömen könne. BERRY und DALY DE BURGH (1931) haben am Hund die Art. pulmonalis und die Artt. bronchiales getrennt durchströmt und gefunden, dass normalerweise Blut von den Artt. bronchiales zur V. pulmonalis fliesst. Dies könnte einerseits durch Gefässverbindungen erfolgen, die die Artt. bronchiales mit den Aesten der Art. pulmonalis verbinden, wie sie von HAYEK (1943) für den Menschen beschrieben wurden. Andererseits wird vielleicht auch beim Hund, wie dies für den Menschen bekannt ist (HAYEK, 1940; CORNING, 1913), das bronchiale Venennetz einen Teil seines Blutes in die Pulmonalvenen führen. BERRY und DALY DE BURGH schätzen, dass unter normalen Bedingungen $2/3$ des Blutes der Bronchialarterien ihren Weg zur V. pulmonalis nehmen, während nur $1/3$ durch die V. azygos zum rechten Vorhof fliesst.

Wir haben uns die Aufgabe gestellt, experimentell zu bestimmen, welche funktionelle Bedeutung den Umgehungsmöglichkeiten des kleinen Kreislaufes unter verschiedenen Bedingungen zukommt.

METHODE

Das Prinzip besteht darin, an isoliert durchströmten, überlebenden Lungen von Katzen und Kaninchen eine genau bekannte Menge korpuskulärer Elemente bestimmter Grösse in die Art. pulmonalis zu geben, und dann zu kontrollieren, wieviel von diesen Teilchen die Lungen passieren.

Wir verwendeten dazu ca. 30 Kaninchen von durchschnittlich 2 kg Gewicht in tiefer Urethannarkose (1,4 g/kg s.c. als 20%ige Lösung), ferner ca. 20 mit Dial narkotisierte Katzen (je 0,03 g/kg s.c. und i.p.).

Nach Einbinden einer Kanüle in die Trachea wurden die Lungen mit einer Atmungspumpe beatmet. Die Atmungsfrequenz betrug ca. 40 pro Minute, das Atemzugsvolumen ca. 20 ccm. Der Thorax wurde eröffnet, die Lungen und das Herz freipräpariert. Dann erhielt das Tier zur Verhinderung der Blutgerinnung 5 mg/kg Liquoid i.v. Nun wurde der rechte Ventrikel angeschnitten und durch ihn in die Art. pulmonalis eine Kanüle eingeführt, durch welche die Durchströmungsflüssigkeit floss. Diese durchströmte die Lungen, um am linken Vorhof, der angeschnitten wurde, den Kreislauf zu verlassen. Als Durchströmungs-

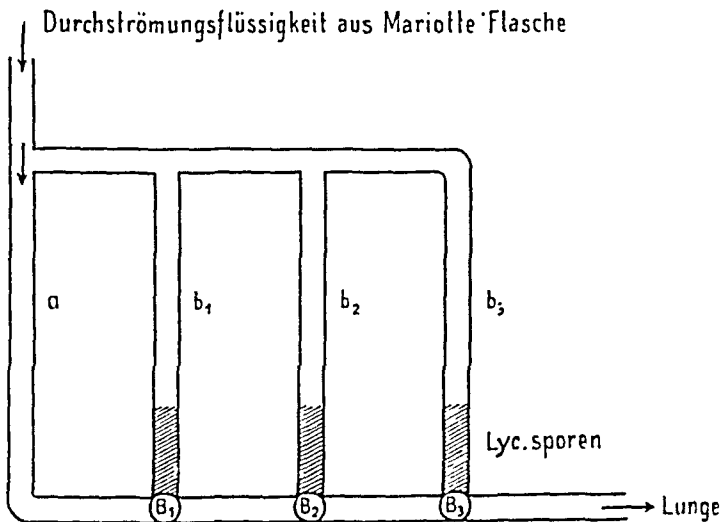


ABB. 1

In den Rohren b_1 - b_3 sind jeweils bekannte Mengen Lycopodiumsporen eingeschlossen. Normalerweise fließt die Durchströmungsflüssigkeit durch das Rohr a zur Lunge. Durch Umschalten eines der Dreiweghahnen B_x fließt diese durch das zugehörige Rohr und schleust dabei die darin befindlichen Sporen in die Lunge.

flüssigkeit diente Tyrodelösung von 40° C, die aus einer Mariotte'schen Flasche unter konstantem Druck durch die Kanüle in die Art. pulmonalis eingelassen wurde.

Als korpuskuläre Elemente verwendeten wir Bärlappsporen (Semen Lycopodii). Diese wurden schon von VULPIAN (1875), STEINACH (1884) und BOURCERET (1885) zur Untersuchung gewisser Gebiete des grossen Kreislaufes an der menschlichen und tierischen Leiche benützt. Die Sporen sind angenähert kugelförmig und haben einen Durchmesser von 28-32 μ . Da nach HAYEK (1940-1941) die Kaliber der echten arterio-venösen Anastomosen der Lunge ungefähr 40 μ , die der Riesenkapillaren der Pleura 20-50 μ betragen, ist zu erwarten, dass die Sporen vom arteriellen Gebiet des Lungenkreislaufes durch die Kurzschlüsse in das venöse Gebiet übertreten können, währenddem sie die Kapillaren natürlich nicht zu passieren vermögen.

Die Eingabe der Sporen erfolgte nach dem in der schematischen Abbildung 1 angegebenen Verfahren: Anstelle durch das Rohr *a* konnte durch Drehen der entsprechenden Dreiweghahnen an *B*₁, *B*₂ oder *B*₃ die Durchströmungsflüssigkeit auch durch das Rohr *b*₁, bzw. *b*₂ oder *b*₃ geleitet werden. In diese Rohre (*b*₁₋₃) wurden bestimmte Mengen Lycopodiumkörner ($2 \cdot 10^5$ in 0,2 ccm 0,9 %iger NaCl-lösung) eingebracht (TAB. I, Kol. 6), die dann jeweils beim Umschalten in den Lungendurchfluss geschleust werden konnten. Der Strömungswiderstand in den Rohren *a* und *b* war gleich gross.

Dass das System in der beschriebenen Weise für unsere Versuchszwecke einwandfrei funktionierte, wurde auf folgende Art gezeigt: Anstelle von Lycopodiumsporen setzten wir der Perfusionsflüssigkeit bekannte Mengen von Erythrocyten zu. (An zwei Kaninchenlungen wurden je dreimal $1,4 \cdot 10^9$ Erythrocyten in 0,4 ccm 0,9 %iger NaCl-lösung zugegeben). Diese konnten in der aus dem linken Vorhof ausfliessenden Flüssigkeit tatsächlich vollzählig wieder gefunden werden (mittlere Abweichung $\pm 2,5$ %; die grösste Differenz zwischen der in die Lunge eingelassenen Erythrocytenzahl und der im Ausfluss wieder gefundenen war $-4,3$ %).

Um mit unserer Versuchsanordnung möglichst alle Aenderungen zu erfassen, die beim intakten Tier am Lungenkreislauf etwa auftreten könnten, wurde in den verschiedenen Versuchen der Einflussdruck, das Atemzugsvolumen und die Atmungsmittellage variiert; ausserdem wurden in einigen Fällen der Perfusionsflüssigkeit gewisse gefässwirksame Pharmaka zugesetzt. (Die betr. Grössen bzw. Pharmaka sind in den Kolonnen 1-4 der Tab. I angegeben).

Der Einflussdruck in die Art. pulmonalis wurde für den Grossteil der Versuche auf 30 cm H₂O gehalten, da nach der Literatur der Pulmonalisdruck für die meisten Warmblüter und auch für den Menschen mit 20-30 cm H₂O angegeben wird (DRINKER, 1925; v. EULER, 1946; COURNAND, 1947; DEXTER, 1947; LOGARAS, 1947; LAGERLÖF, 1948). In einzelnen Fällen erhöhten wir den Druck auf 100 cm H₂O (TAB. I, Kol. 1).

Beatmet wurden die Lungen normalerweise mit einem Atmungsvolumen von ca. 20 ccm auf Kollapslage, d.h. die Lungen kollabierten während den Inspirationspausen vollständig. Die Kollapslage entspricht bei den Kaninchen einem Restvolumen von etwa 10 ccm, bei den Katzen von ca. 15 ccm. Wir führten auch Versuche durch an Lungen mit erhöhter Exspirationslage (TAB. I, Kol. 3). Diese wurde dadurch erhalten, dass in den Expirationsweg ein zusätzlicher Widerstand geschaltet wurde; die expiratorische Atmungslage betrug dabei etwa 30 ccm

TABELLE I

	I	2			3	4	5		6	7
No.	Druck in cm H ₂ O	Perfusionsflüssigkeit			Atem- lage in ccm	Atem- zugs- vol. in ccm	Durchfluss in ccm/min		Anzahl d. zuge- gebenen Lyc.- sporen	davon wieder gefun- den
		Ty- rode	+Pris- col 5.10 ⁻⁵	+Pyri- benza- min 10 ⁻⁷			Be- ginn	Ende		
Kaninchen										
12	30	+			10	20	110	90	2.10 ⁵	keine
13	»	+			10	20	100	—	4.10 ⁵	»
42	»	+			10	20	110	104	2.10 ⁵	»
43	»	+			10	20	100	104	»	»
45	»	+			10	40	84	80	»	»
44	»	+			30	20	120	122	»	»
33	»	+			30	20	140	130	»	»
46	»	+			30	40	100	106	»	»
49	»	+	+		10	20	124	120	»	»
53	»	+	+		10	40	124	110	»	»
52	»	+	+		30	20	82	76	»	»
54	»	+	+		30	40	126	122	»	»
59	»	+		10 ⁻⁶	10	20	114	116	»	»
61	»	+		10 ⁻⁶	10	20	138	134	»	»
71	»	+		10 ⁻⁶	10	40	118	120	»	»
72	»	+		10 ⁻⁶	30	40	138	124	»	»
16	»	+	+	+	10	20	110	90	»	»
55	»	+	+	+	10	20	107	102	»	»
57	»	+	+	+	10	40	116	96	»	»
15	»	+	+	+	30	20	92	92	»	»
22	»	+	+	+	30	20	124	110	»	»
56	»	+	+	+	30	40	124	108	»	»
60*	»	+			10	20	96	100	»	»
62*	»	+			10	30	96	82	»	»
63*	»	+			30	40	72	86	»	»
64*	»	+			30	20	70	68	»	»
69	100	+			10	20	264	286	10 ⁶	»
23	»	+			10	40	260	250	»	»
24	»	+			30	20	260	260	»	»
58	»	+	+		10	20	212	216	»	»
25	»	+	+		30	40	212	200	»	»
26	»	+	+	+	10	20	212	204	»	»
27	»	+	+	+	30	40	220	210	»	»
Katzen										
73	30	+			15	20	74	70	2.10 ⁵	keine
74	»	+			15	40	118	120	»	»
75	»	+			35	20	112	114	»	»
76	»	+			35	40	120	118	»	»
77	»	+	+		15	20	120	116	»	»
78	»	+	+		15	40	122	130	»	»
79	»	+	+		35	20	144	142	»	»
80	»	+	+		35	40	126	120	»	»
81	»	+		+	15	20	134	138	»	»
82	»	+		+	15	40	124	120	»	»
84	»	+		+	35	20	124	132	»	»
83	»	+		+	35	40	120	120	»	»
85	100	+			15	20	240	246	»	»
86	»	+			15	40	264	260	»	»
89	»	+			35	20	288	276	»	»
87	»	+			35	40	282	303	»	»

(*) Die isolierten Lungen waren vor der Durchströmung 18-24 Stunden bei 4° C gehalten worden.

Generell wurden die Versuche an jedem Tier zweimal wiederholt, wobei das Ergebnis immer dasselbe blieb, d.h. Lycopodiumsporen wurden in der aus dem linken Vorhof ausströmenden Flüssigkeit nie gefunden.

(Kollapslage + 20 ccm). Ferner beatmeten wir in einem Teil der Versuche die Lungen mit 40 ccm Atemzugsgrösse (TAB. I, Kol. 4). Damit ist in unseren Versuchen — zumindest für Kaninchen, die nach BUCHER (1942) auf einer expiratorischen Atmungslage von ca. 50 ccm/2 kg atmen — die normalerweise für Katzen und Kaninchen in Betracht kommende Lungenentfaltung nach oben und unten hin bestrichen worden.

Ausserdem wurde in einzelnen Versuchen der Perfusionsflüssigkeit ein Sympathicolyticum oder ein Antihistaminicum oder beides zugesetzt (TAB. I, Kol. 2), in einer Konzentration, von der man erwarten durfte, dass sie einen durch Sympathin bzw. Histamin verursachten Verschluss der arteriovenösen Anastomosen zu beheben im Stande wäre. Wir haben dabei in erster Linie an diese beiden Stoffe gedacht, weil mit ihnen im Experiment am Kaninchenohr tatsächlich Verschluss dieser Gefässe zu erhalten ist (GRANT, 1930; MÄRK, 1941; SANDERS, 1947). Hierbei hat sich die Methode der isoliert durchströmten Lunge auch insofern von Vorteil erwiesen als (im Gegensatz zum lebenden Tier) bei der Anwendung der Sympathicolytica bzw. Antihistaminica keine Rückwirkungen auf das Herz zu befürchten waren. Als Sympathicolyticum verwendeten wir Priscol (HARTMANN-ISLER, 1939; MEIER-MÜLLER, 1939) in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ und als Antihistaminicum Pyribenzamin (MAYER et al., 1945) in Konzentrationen von 10^{-7} – 10^{-6} .

Die aus dem linken Vorhof ausfliessende Flüssigkeit wurde quantitativ gemessen und auf das Vorkommen von Samen *Lycopodii* untersucht (TAB. I, Kol. 7).

ERGEBNISSE

In der aus dem linken Vorhof ausströmenden Flüssigkeit sind weder bei Kaninchen noch bei Katzen je *Lycopodium*sporen nachgewiesen worden. Dies trotzdem wir die Versuche unter stark verschiedenen Bedingungen durchgeführt hatten. So wurden verändert: die Atemzugsgrösse (20–40 ccm), die expiratorische Atmungslage (10–30 ccm), der hydrostatische Druck (30–100 cm). Ferner hatten wir in einigen Fällen der Perfusionsflüssigkeit Priscol ($5 \cdot 10^{-5}$) und Pyribenzamin (10^{-7} – 10^{-6}) zugesetzt.

In Anbetracht dieses eher unerwarteten Resultates wurde in einigen Nachversuchen am Kaninchenohr, das nachgewiesenermassen (HOYER, 1876; GRANT, 1930; CLARK, 1934) zahlreiche arteriovenöse Anastomosen besitzt, die Brauchbarkeit der Methode experimentell geprüft. Wir durchströmten isolierte Kaninchenohren mit Tyrodelösung, der Sus-

pensionen von Lycopodiumsporen zugesetzt wurden. Nacheinander wurden mehrmals Sporen Mengen von 10^4 der Durchströmungsflüssigkeit zugesetzt; der Durchfluss nahm dabei nicht ab. An ca. 15 Kaninchenohren, an denen insgesamt etwa 50 Versuche durchgeführt wurden, waren in der aus der Vene ausströmenden Flüssigkeit meistens ca. 40 % der Lycopodiumsporen nachzuweisen; Werte von 50 % waren nicht selten. Damit wird der mögliche Einwand beseitigt, dass nämlich nicht die Grösse der Sporen, sondern irgendeine andere Eigenschaft ihr Durchtreten vom arteriellen Teil des kleinen Kreislaufes in den venösen Teil verhindert habe.

DISKUSSION

Das wichtigste Ergebnis ist, dass weder bei Katzen noch bei Kaninchen Kurz- und Nebenschlüsse in der Lunge vorhanden sind, wie sie von HAYEK (1940; 1943) für den Menschen beschrieben wurden. Der mögliche Einwand, dass solche zwar vorhanden seien, dass aber die Methode zum Nachweis unzulänglich gewesen sei, wird weitgehend entkräftet durch die Kontrollen am Kaninchenohr und die verschiedenen Versuchsanordnungen, wie verschieden grosses Lungenvolumen, verschiedener Einflussdruck, Zusatz gefässerweiternder Pharmaka.

Wenn man nun annimmt — wozu man wohl berechtigt ist — dass die *normale* Regulation des Lungenkreislaufes bei der carnivoren Katze und dem herbivoren Kaninchen einerseits und beim Menschen andererseits nicht grundsätzlich verschieden ist, dann kommt man zum Schluss, dass die bei letzterem nachgewiesenen Kurz- und Nebenschlüsse der Lunge für die normale Regulation des Lungenkreislaufes bedeutungslos sein dürften ⁽¹⁾. Diese dürfte vielmehr durch das rechte Herz selbst und dann vor allem auch durch die Atmungstätigkeit erfolgen, wobei die Auswirkungen der letzteren sich vorwiegend am alveolären Kapillarsystem abspielen dürften.

Von Regulationsmechanismen des kleinen Kreislaufes, die über das Herz selbst zustandekommen, kennt man bisher einzig den von SCHWIEGK (1935) beschriebenen Lungenentlastungsreflex. Dieser wird bei Hunden durch Druckanstieg in den Lungengefässen ausgelöst und führt zu einer Verlangsamung der Herzfrequenz und einer Senkung des Blutdrucks im Körperkreislauf.

Von Regulationsmechanismen, die über eine Aenderung der Atmungs-tätigkeit effektiv werden, sind bereits mehrere bekannt : Untersuchungen an isolierten Lungen und am Tier mit *offenem Thorax* ergaben, dass der Strömungswiderstand im kleinen Kreislauf bei Dehnung einer kollabierten Lunge allmählich abnimmt (KRAUSS, 1934; CHIURCO), angeblich deshalb, weil die in Kollapslage stark geschlängelten Gefässe nach und nach gestreckt und damit entfaltet werden (WAGNER, 1940). Wird die Lunge weiter gedehnt, dann steigt schliesslich der Widerstand wieder an (KRAUSS, 1934), was nach WAGNER (1940) vor allem auf der sog. Querkontraktion der Gefässe beruhen soll. Ein solcher, durch Lungendehnung entstandener, erhöhter Widerstand dürfte nach BORDEN et al. (1948) beim chronischen Lungenemphysem vorkommen, bei dem diese einen deutlich erhöhten Druck in der Art. pulmonalis festgestellt haben. Damit ist eine Abhängigkeit der Kreislaufverhältnisse der Lunge vom Grad der Lungenentfaltung gezeigt. Die Vasomotoren scheinen im Vergleich zu dieser Regulation nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Lungenblähung nämlich vermag im kleinen Kreislauf den Druck viel stärker zu steigern als Vasomotorenreizung (DALY DE BURGH, 1932; DIEBOLD, 1947). Untersuchungen am Tier mit *geschlossensem Thorax* andererseits ergaben, dass die atmungssynchronen Blut-druckschwankungen im grossen und kleinen Kreislauf gleich gerichtet sind, und zwar erfolgt in beiden Systemen bei der Inspiration ein Druckabfall und bei der Expiration ein Druckanstieg (JOHNSON et al. 1937). Nach HOOKER (1914), WIGGERS (1922), CAHOON (1940), BOYD (1941) u.a. fliesst während der Inspiration mehr Blut ins rechte Herz und als Folge davon erhöht der rechte Ventrikel sein Schlagvolumen; gleichzeitig füllt sich (beim Hund) der linke Ventrikel eher weniger (SHULER, 1942), was SHULER et al. auf eine, während der Inspiration erfolgende Kapazitätzunahme im Lungenkreislauf zurückführen. Daher befindet sich während der für die Belüftung günstigsten Zeit Blut in grösseren Mengen in der Lunge als während der Expiration.

Wenn wir nun fragen, worin denn die Bedeutung der am Menschen von HAYEK (1940, 1942) nachgewiesenen Kurz- und Nebenschlüsse liegen könnte, so scheinen uns folgende Möglichkeiten gegeben :

Nach HOCHREIN (1933) soll die Lunge eine von der Atmung unabhängige Blutspeicherungsfähigkeit (bis zu 25% der gesamten Blut-menge) besitzen, was allerdings von REIN (1933) und LIEBERMEISTER (1934) bestritten wird. Aehnliche Ansichten wie HOCHREIN hat schon KUNO (1917) vertreten. Wenn man diese als richtig annimmt, dann wäre es denkbar, dass die Blutspeicherung durch die Kurz- und Nebenschlüsse zustande kommt, indem ihre Eröffnung zu einer Umgehung

bisher durchbluteter Kapillargebiete führt und damit das in ihnen liegende Blut zu Depotblut wird.

SAUERBRUCH (1928), PFEIFER (1934) und DIEBOLD (1947) haben über Beobachtungen berichtet, wonach einzelne Lungenlappen wechselnden Blutgehalt zeigen können. Der Umstand, dass das Blut bei einer Oeffnung der Kurz- und Nebenschlüsse dem geringeren Widerstand folgend durch diese abfliessen würde, und damit die Durchblutung einzelner Bezirke herabgesetzt würde, könnte zur Erklärung dieses Phänomens dienen. Wir möchten jedoch betonen, dass, wenn immer im kleinen Kreislauf grössere Mengen Blut durch Kurzschlüsse von den alveolären Kapillaren ferngehalten werden, es zwangsläufig zu einer merklichen Hypoxaemie und Hyperkapnie im gesamten Körper kommen müsste. (In dieser Beziehung wirken sich Kurz- und Nebenschlüsse im kleinen Kreislauf eben anders aus als im grossen, da dort die Umgehung eines Organs primär nur eine lokale Störung bedingen wird.) Dieser Zustand dürfte aber nicht die Regel sein; es ist vielmehr anzunehmen, dass er nur dann eintreten wird, wenn die Sauerstoffversorgung anderen, im Moment dringenderen Aufgaben vorübergehend untergeordnet wird, d.h. in Ausnahmезuständen, wobei die Kurz- und Nebenschlüsse des Lungenkreislaufs eigentliche *Notfallsfunktionen* ausüben würden.

ZUSAMMENFASSUNG

Isolierte, überlebende Lungen von Kaninchen und Katzen wurden unter verschiedenen Bedingungen von der Art. pulmonalis aus durchströmt. Der Durchströmungsflüssigkeit zugesetzte Lycopodiumsporen von ca. $30\ \mu$ Durchmesser wurden in der aus dem linken Vorhof ausströmenden Flüssigkeit nie nachgewiesen. Daraus wird einerseits geschlossen, dass bei Kaninchen und Katzen keine Kurz- und Nebenschlüsse des Lungenkreislaufes vorhanden sind und andererseits, dass die von Anatomen beschriebenen Kurz- und Nebenschlüsse der Lunge beim Menschen normalerweise keine bedeutenden Funktionen erfüllen.

Es werden Möglichkeiten diskutiert, bei denen die Kurz- und Nebenschlüsse der Lunge sog. Notfallsfunktionen ausüben könnten.

Die Arbeit wurde ausgeführt auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. K. BUCHER.

LITERATUR

- BERRY, J. L. and DALY, I. DE BURGH. *Proc. Roy. Soc. B.*, 1931, 109, 214 und 319.
- BORDEN, C., WILSON, R. H. und EBERT, R. V. *J. Lab. and Clin. Med.*, 1948, 33, 1453.
- BOURCERET, P. *Circulations locales*, 1885, (Paris).
- BOYD, T. E. and PATRAS, M. C., *Am. J. Physiol.*, 1941, 134, 74.
- BUCHER, K. *Verh. Schweiz. Physiol.*, 1942.
- CAHOON, D. H., JOHNSON, V. and MICHAEL, I. E. *Am. J. Physiol.*, 1940, 129, 326.
- CHIURCO, zit. n. KRAUSS.
- CLARA, M. *Die arteriovenösen Anastomosen* (Leipzig), 1939.
- CLARK, E. R. und CLARK, E. L. *Am. J. Anat.*, 1934, 54.
- CORNING, H. K. *Lehrbuch der topograph. Anat.* (Wiesbaden), 1913.
- COURNAND, A. *Bull. New York Acad. Med.*, 1947, 23, 27.
- DALY, I. DE BURGH und EULER, U. S. v., *Proc. Roy. Soc., B.* 1932, 110, 92.
- DEXTER, L., HAYNES, F. W., BURWELL, C. S., EPPINGER, E. C., SAGERSON, R. P. und EVANS, J. M. *J. Clin. Invest.*, 1947, 26, 554.
- DIEBOLD, O. *Dtsch. Ztschr. f. Chir.*, 1947, 248, 611.
- DRINKER, C. K., AGASSIZ, A. *Am. J. Physiol.*, 1925, 72, 151.
- EULER, U. S. v. und LILJESTRAND, G. *Act. Physiol. scand.*, 1946, 12, 301.
- GRANT, R. T. und BLAND, E. F. *Heart*, 1930, 15, 385.

- GROSSER, O. *Arch. f. mikrosk. Anat.* 1902, 60, 191.
- HARTMANN, M. und ISLER, H. *Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.*, 1939, 192, 141.
- HAYEK, H. v. *Ztschr. f. Anat.*, 1940, 110, 412; *Anat. Anz.* 1942, 93, 155; *Ztschr. f. Anat.*, 1943, 112, 221.
- HOCHREIN, M. *Ztschr. f. Kreislaufforschung*, 1934, 24.
- HOCHREIN, M. und MATTHES, K. *Pflügers Arch.*, 1933, 231, 207 und 233, 1.
- HOOKE, D. R. *Am. J. Physiol.*, 1914, 35, 73.
- HOYER, H. *Arb. aus d. Labor. d. med. Fak. Warschau*, 1876, 3, 113, zit. n. CLARA.
- JOHNSON, V., HAMILTON, W. F., KATZ, L. N. und WEINSTEIN, W. *Am. J. Physiol.*, 1937, 120, 624.
- KRAUSS, H. *Dtsch. Ztschr. f. Chir.*, 1934, 243, 505.
- KUNO, Y. *J. Physiol.*, 1917, 51, 154.
- LAGERLÖF, H. und WERKÖ, L. *Act. physiol. Scand.*, 1948, 16, 75.
- LIEBERMEISTER, K. *Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.*, 1934, 175, 697 und 703.
- LOGARAS, G. *Act. physiol. scand.*, 1947, 14, 120.
- MÄRK, W. *Ztschr. f. mikrosk. anat. Forschung*, 1941, 50, 392.
- MASSON, P. *Les glomus neuro-vasculaires*, (Paris), 1937.
- MAYER, R. L., HUTTRER, C. P. und SCHOLZ. *Science*, 1945, 102, 93.
- MEIER, R. und MÜLLER, R. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 1939, 69, 1271.
- PFEIFER, R. A. *Ber. Physiol.*, 1934, 81, 377.
- REIN, H. *Klin. Wschr.*, 1933, 1, 1.
- SANDERS, A. G. *Internat. physiol. congress Oxford*, 1947.
- SAUERBRUCH, F. *Chirurgie der Brustorgane*, Bd. 1, 1928.
- SCHUMACHER, S. v. *Bruns Beiträge*, 1934, 159, 335; *Ztschr. f. mikrosk. anat. Forschung*, 1938, 43, 107.
- SCHWIEGK, H. *Pflügers Archiv*, 1935, 236, 206.
- SHULER R. H., ENSOR, C., GUNNING, R. E., MOSS, W. G. und JOHNSON, V. *Am. J. Physiol.*, 1942, 137, 620.
- SPANNER, R. *Anat. Anz.*, 1937-38, 85, (Erg. Bd.).
- STEINACH, E. *Sitzber. Akad. Wiss. Wien. Math. Nat. Kl.* 1884, 90, 171.
- VASTARINI-CRESI, G. *Le anastomosi artero-venose nell'uomo e nei mammiferi*, 1903, (Neapel). zit. n. CLARA.
- VULPIAN. *École de Médecine (Paris)*, 1875.
- WAGNER, R. *Verh. d. deutsch. Gesellschaft f. Kreislaufforschung*, 1940, XIII. Tagung, 7.
- WATZKA, M. *Ztschr. f. mikrosk. anat. Forschung*, 1936, 50, 521.
- WIGGERS, C. L. und KATZ, L. N. *Am. J. Physiol.*, 1922, 58, 239.

LABORATORY OF NEUROPHYSIOLOGY, DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY
UNIVERSITY OF MINNESOTA, MINNEAPOLIS

PROPRIOCEPTION AND CONVULSIONS (1)

BY

E. GELLHORN, J. HYDE AND J. GAY

(Received for publication 8-2-1949).

Previous investigations showed on the basis of the study of cortical potentials that nociceptive impulses (1) and stimulation of higher sense organs (2) may greatly enhance convulsive activity. The present study is concerned with the role of proprioceptive impulses in convulsions. No systematic investigations seem to have been made on this problem although clinical observations since HUGHLINGS JACKSON suggest that they may modify convulsive activity. The present work is based on the influence of proprioceptive impulses on cortically induced after-discharges as well as on chemically induced convulsions.

METHODS

The experiments were performed on cats and monkeys (*Macacus Rhesus*) in „Dial” anesthesia (0.45 cc per kilogram i.p.). Potentials were amplified and recorded with an Offner inkwriter from various parts of the cortex. Bilateral silver electrodes having an interelectrode distance of 1 to 2 mm were used. Muscular activity as indicated by electromyograms was recorded with the same apparatus by means of fine copper wires bared for a few mm and sewn into several muscles. Deafferentation of posterior roots of the fore- and hindleg segments followed standard procedures. Proprioceptive impulses were elicited either by stimulation of the peripheral end of S_1 as used by COOPER and CREED (3) or by fixation of an extremity since previous work (4, 5)

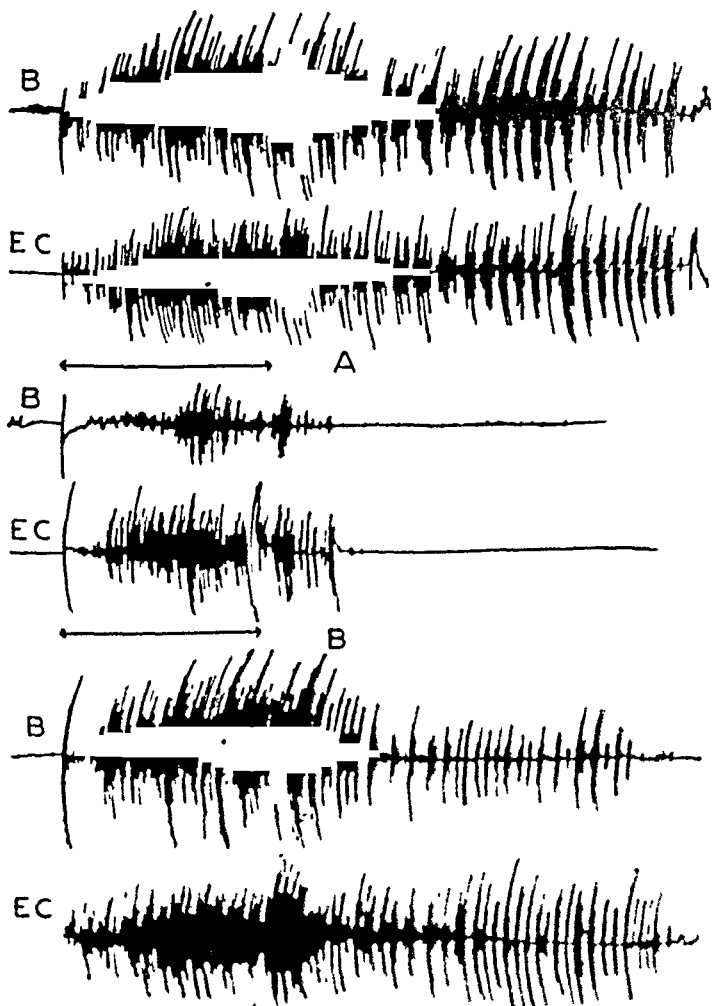
(1) Aided by a grant from the Office of Naval Research.

had shown that proprioceptive impulses resulting from fixating a joint at the appropriate angle greatly increase the muscle response under conditions of cortical stimulation.

RESULTS

I. — *Proprioception and afterdischarge.*

Figure 1 illustrates the effect of fixation of the elbow at an acute and an obtuse angle on the response of biceps and extensor carpi as a flexor point of the motor cortex (Area 4) is stimulated in the monkey. The wrist is not fixated and remains in the same (volar) position. It is clearly shown that a stimulus which elicits only a minimal afterdischarge



in biceps and extensor carpi when the elbow is fixated at an acute angle greatly increases the afterdischarge when the elbow is held at an obtuse angle. The figure shows also that the amplitude of the EMG is greatly increased while the elbow is fixated at an obtuse angle. This illustrates the principle studied earlier that increasing the initial length of a muscle increases its response to cortical stimulation (4, 6) and that this effect

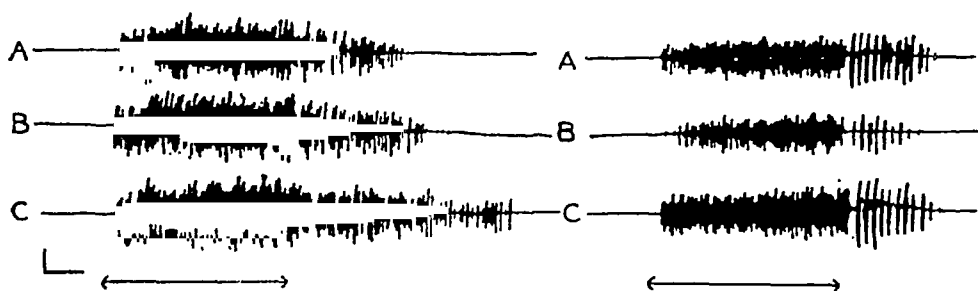


FIG. 2

Effect of deafferentation on afterdischarge, showing change from tonic to clonic type of afterdischarge. Cat, left tibialis. Left column, control series. Right column, after deafferentation. Intensities of right motor cortex stimulation: A. 4.0 V; B. 5.5 V; C. 7.3 V. All at frequency of 90/sec. Calibration 100 microvolts and 1 second.

is greatly magnified by fixation of a joint so that contraction proceeds isometrically. The fact that amplitude of EMG and afterdischarge are increased under similar conditions suggests that the same factors are operative. Earlier experiments (6) suggested that the EMG under conditions of cortical stimulation is directly related to the number of discharging neurons. Since lengthening of a muscle and fixation of a joint greatly increase the amplitude of EMG to a standard cortical stimulus and since this effect is absent after deafferentation (7) it was inferred that proprioceptive impulses facilitate the cortically induced response and thereby increase the number of discharging neurons. This interpretation seems to be applicable to the phenomenon of afterdischarge as shown in figure 1.

If proprioceptive impulses intensify the afterdischarge it was to be expected that deafferentation would diminish it. This is indeed the case. Figure 2 illustrates a typical experiment in which the effect on EMG and afterdischarge of stimulation of the motor cortex with different intensities is demonstrated. It is clearly seen that the duration of the afterdischarge is greatly diminished after deafferentation. Moreover, its character is altered inasmuch as it seemed to be of a tonic nature in the normal cat but was clonic in appearance after deafferentation. This discontinuous form of the afterdischarge after deafferentation is

distinctly seen in the EMG of figure 2. In other experiments deafferentation caused only a reduction in the quantity of the afterdischarge without altering its quality.

II. — *Proprioception, strychnine spikes, and strychnine convulsions.*

Numerous experiments were performed in cats and monkeys on the influence of proprioceptive impulses on convulsive cortical activity induced by topical application of small pledgets of strychnine. The stimulation of the peripheral end of the motor root S_1 was used to induce afferent proprioceptive impulses. It has been shown previously that proprioceptive impulses thus induced exert distinct effects particularly

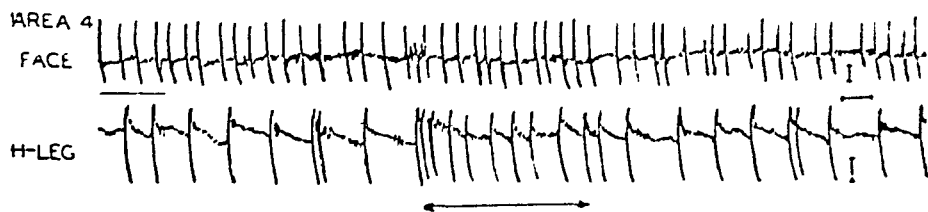
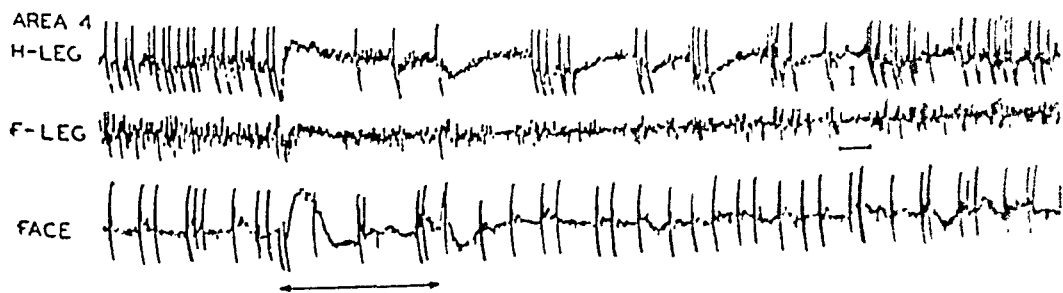


FIG. 3

Monkey. Dial anesthesia. Effect of stimulation (arrow) of the peripheral end of S_1 (1.3 V, 90/sec.) on strychnine potentials of the contralateral face and hindleg area. Calibration 300 microvolts and one second.



Same experiment, same stimulation.
the result of stimulation of S_1 .

of the strychnine potentials decreases. The results of these experiments are similar to those obtained when the effect of nociceptive impulses was studied on convulsive potentials (1).

In another series of experiments an attempt was made to determine the action of passive movements on topically induced convulsive cortical potentials. This form of proprioceptive stimulation is far less effective in „Dial” anesthesia than that induced by stimulation of the peripheral end of a centrally sectioned motor spinal root but in several experiments positive effects could be obtained. Thus figure 5 shows that passive

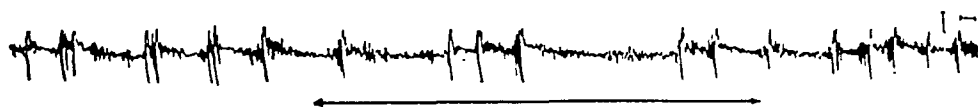


FIG. 5

Effect of passive flexion of the hindleg (arrow) on the frequency of strychnine potentials in the contralateral sensori-motor cortex of the cat. Calibration 300 microvolts and one second.

flexion reversibly diminished the frequency of convulsive discharges in the contralateral sensori-motor cortex. Since such effects could not be elicited by touch and pressure on the skin it may be inferred that the action on the strychnine potentials of the cortex of passively moving a joint is due to proprioceptive impulses.

In a final series of experiments pledgets of strychnine were applied to the exposed dorsal columns of the spinal cord and convulsive movements were recorded from several muscles by means of EMG's. After a steady state had been reached the skin of one hind leg was separated from its underlying tissue and, in the second phase of the experiment, the posterior roots receiving their supply from this hind leg were ligated. This procedure was then repeated on the other side. These experiments gave very uniform results (TABLE I) showing that „skinning” had no significant effects on the number of convulsive movements but that deafferentation abolished them. The data indicate that at least in this particular form of chemically induced convulsions proprioceptive impulses play a predominant role in the maintenance of convulsive movements. It is, of course, not inferred from these experiments that cutaneous stimuli are without effect on convulsive movements or potentials but only that this form of stimulation is negligible under the experimental conditions („Dial” anesthesia) chosen for this investigation.

TABLE I

Number of convulsive movements following strychninization of posterior columns of the cat (1)

	Movements per minute	
	Right tibialis	Left tibialis
Control	15	15
Skinned	20	11
Deafferented	1	0

DISCUSSION

The experiments described in this paper furnish evidence, on the basis of the study of afterdischarge and chemically induced convulsions, for the fact that convulsive potentials and movements are greatly influenced by proprioceptive impulses. Fixation of a joint leads through proprioceptive reinforcement not only to an increased amplitude of the EMG in response to a standard cortical stimulus but also to an increased afterdischarge. The roles previously established for this proprioceptive facilitation are valid for afterdischarges. It was shown earlier that biceps and extensor carpi form a functional complex in conditions of cortical (3a, 4, 5) and reflex (9) stimulation. Proprioceptive reinforcement of one component (e.g. of the biceps) leads to an intensification of the motor discharge in the other component of this complex. A similar statement applies for the triceps complex. That this role is valid for the afterdischarge was illustrated in figure 1. However, the proprioceptive facilitation may remain restricted to the stretched and fixated muscle. Depending on the intensity of the cortical stimulation and the degrees of proprioceptive reinforcement induced by stretching and fixation of the proper joint the afterdischarge may vary within wide limits. Apparently the thresholds for a muscular response and afterdischarge are lowered by proprioceptive reinforcement (e.g. fixation of elbow at an obtuse angle if a biceps point is stimulated) and raised by proprio-

(1) A 2 × 3 mm piece of filter paper soaked in 3 % strychnine was placed at L₁ in a „Dial“-cat. Skinning and deafferentation of the right hindleg preceded similar procedures at the left. The convulsive movements were recorded by means of E.M.G.'s.

ceptively reinforcing the antagonist (fixation of elbow at an acute angle in the present example). That afterdischarge may persist after deafferentation as has been observed by the Sherringtonian school (cf 12) has been confirmed in our experiments on cortical stimulation. It was also found that deafferentation diminishes the duration and tonicity of cortically induced afterdischarge.

The changes in focal strychnine spikes of the cortex resulting from proprioceptive impulses are similar to those following stimulation of nociceptive receptors. In an earlier study (1) it was emphasized that other conditions being equal the weaker stimulus tends to decrease the frequency of convulsive discharges whereas the stronger stimulus increases their frequency. It was assumed that the former change was due to asynchrony of discharge whereas the latter resulted from asynchrony plus recruitment of previously discharging neurons (cf also (11), and the older literature cited in this paper). These factors may account for the alteration in cortical spike frequency reported in the present investigation although no relation could be established between the intensity of the peripheral stimulation of S_1 and the change in direction of the frequency of cortical spikes. However it must be born in mind that the relation between the intensity of S_1 stimulation and the number of excited proprioceptive nerves (and their rate of discharge) is not known (1). Apparently the type of change in spike frequency depends to a considerable degree on central factors. In several animals it was observed that the same stimulus which at an earlier phase (2) of the experiment induced an increase in the rate of convulsive discharge later caused a decrease. This suggests that the degree of recruitment following afferent stimulation depends on the degree of strychnine spiking.

The change in spike frequency was greater in the hindleg area on stimulation of S_1 than in the foreleg and face area as was to be expected from similar experiments involving the normal nonconvulsive cortex. In these studies a similar gradient of excitation was noted with the maximal excitation in the contralateral hindleg zone of area 4.

When moderate convulsive movements were induced in the hindlegs by topical application of strychnine to the dorsal columns in a lumbar segment, the role of proprioception could be readily demonstrated, since convulsive activity was practically unaltered by elimination of cutaneous

(1) It is planned to resume work on this problem by studying the effect on spike potentials of the motor cortex of stimulating proprioceptive fibers with varying intensities and frequencies.

(2) The spike frequency was then somewhat lower than later.

receptors but disappeared after deafferentation. If through intravenous injection of convulsive drugs generalized convulsions were produced, there was, in agreement with older observations (MOTT and SHERRINGTON, 10), no significant difference between normal and deafferented legs. However, in view of the overwhelming evidence of the general action of afferent impulses in precipitating and intensifying convulsions (1, 2) and the particular role of proprioceptive impulses described in this paper these negative experiments are hardly significant. It seems to be probable that the high degree of convulsive activity which characterizes generalized convulsions is less easily diminished by factors influencing convulsions than are the milder topically induced spike potentials and convulsive movements in which the action of proprioception could be clearly shown.

SUMMARY

The role of proprioception in convulsive activity was studied by its action on topically induced strychnine potentials and movements and on the form and degree of afterdischarge resulting from stimulation of the motor cortex in anesthetized cats and monkeys.

It was found that the afterdischarge is significantly decreased after deafferentation and that in some experiments the tonic component of the afterdischarge is decreased. In such cases the tonic afterdischarge seen in the normal muscles may be changed into a clonic afterdischarge after deafferentation. Conversely it was found that under conditions of fixation of the proper joint the afterdischarge was increased on cortical stimulation as a result of increased proprioceptive impulses.

Strychnine spikes induced in the sensori-motor area are either increased or decreased in frequency when proprioceptive impulses impinge upon the cortex as a result of stimulation of the peripheral end of a motor lumbar root. It is noted that proprioceptive impulses originating in the hindleg muscles alter the convulsive spikes more in the hindleg- than in the foreleg- or face-area of the contralateral motor cortex (area 4). In sensitive preparations passive movements may likewise result in alterations in frequency of the convulsive activity of the sensori-motor cortex.

Convulsive movements of the hindleg resulting from application of strychnine to the posterior columns of the lumbar spinal cord are abolished by deafferentation although elimination of cutaneous receptors exerts no significant influence on these convulsions.

REFERENCES

1. — E. GELLHORN and H. BALLIN. *Arch. Neurol. and Psychiat.*, 1948, 59, 118-133.
2. — E. GELLHORN and H. BALLIN. *Arch. Neurol. and Psychiat.*, 1948, 59, 496.
3. — S. COOPER and R. S. CREED. *J. Physiol.*, 1927, 62, 273.
- 3a. — J. F. BOSMA and E. GELLHORN. *Brain*, 1947, 70, 127.
4. — E. GELLHORN. *Brain*, 1948, 71, 26.
5. — E. GELLHORN. *Brain*. In press.
6. — G. N. LOOFBOURROW. *J. Neurophysiol.*, 1948, 11, 153.
7. — J. HYDE and E. GELLHORN. In Press.
8. — J. GAY and E. GELLHORN. Presented at the meeting of the Am. Physiol. Soc., Minneapolis, September 1948.
9. — G. N. LOOFBOURROW and E. GELLHORN. *Am. J. Physiol.*, 1948, 154, 433 and unpublished observations.
10. — F. W. MOTT and C. S. SHERRINGTON. *Proc. Roy. Soc. London B*, 1895, 57, 481.
11. — E. GELLHORN and H. M. BALLIN. *Am. J. Physiol.*, 1946, 146, 630.
12. — R. S. CREED, D. DENNY-BROWN, J. C. ECCLES, E. G. T. LIDDELL and C. S. SHERRINGTON. *Reflex Activity of the Spinal Cord.*, Oxford, 1932.

THE LILLY RESEARCH LABORATORIES

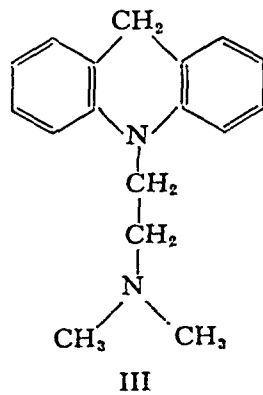
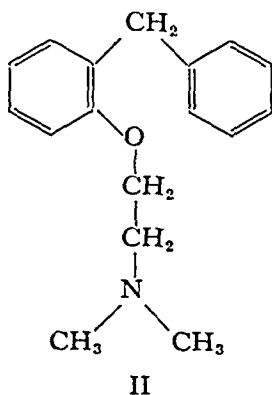
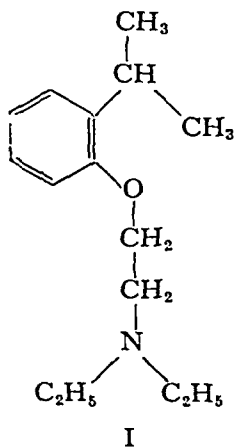
ANTI-HISTAMINIC AGENTS DERIVED FROM DIPHENYLMETHANE

BY

JACK MILLS, EWALD ROHRMANN, WILLIAM G. DINWIDDIE
AND HENRY M. LEE

(Received for publication 27-2-1949).

In 1937 BOVET and STAUB (1) demonstrated that certain dialkylaminoalkyl ethers derived from phenols have the property of counteracting the action of histamine. The serious toxic reactions (2) produced by the most active compound in this series, thymoxyethylenediethylamine (I), and the discovery of the potent ethylenediamine series of antihistaminic agents discouraged further investigation of compounds of this type. Several years ago, in the course of a systematic study of the structure necessary for antihistaminic activity, dialkylaminoalkylphenolic ethers were reinvestigated in these laboratories.

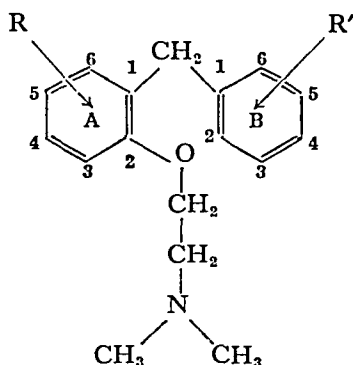


One of the compounds tested, 2-(β -dimethylaminoethoxy) diphenylmethane (1) (II), was found to have an antihistaminic activity of greater than twice that of benadryl.

(1) This compound and many related phenolic ether compounds have been prepared independently in the Bristol Laboratories (3).

The low toxicity of this compound coupled with the relatively strong action encouraged us to study the effects of nuclear substitution on antihistaminic activity in this series. The activities of the substitution products were compared with that of benadryl by a method previously described (4) which employs the isolated guinea pig intestinal muscle. The effects of nuclear substitution are presented in Table I.

TABLE I
*The Effect of Nuclear Substitution on Activity Expressed
On a Molar Basis with Benadryl = 1*



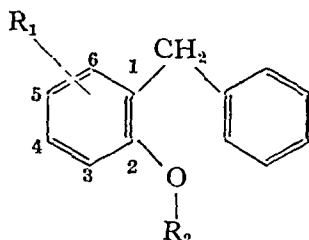
No.	R	R'	Activity
1	H	H	2.1
2	H	4- <i>iso</i> C ₃ H ₇	0.2
3	H	4-Cl	1.8
4	H	4-CH ₃ O	0.05
5	H	3-CH ₃	0.5
6	5- <i>t</i> -C ₄ H ₉	H	0.05
7	5-CH ₃	H	2.3
8	4-CH ₃	H	2.5
9	3-CH ₃	H	0.2
10	5-CH ₃ O	H	0.2
11	4-CH ₃ O	H	0.55
12	3-CH ₃ O	H	0.1
13	5-Cl	H	3.1
14	4-Cl	H	1.6
15	3-Cl	H	0.1
16	5-Cl	2,4-diCl	0.05
17	5-Cl	4-Cl	1.5
18	5-Cl, 4-CH ₃	H	1.8

Nuclear substituents in the benzyl portion of the molecule, ring B, produced less active compounds. More encouraging results were obtained from substituents in the phenolic nucleus, ring A (TABLE I). Although all substituents at position 3 had an unfavorable influence, introduction of a methyl group at positions 4 and 5 resulted in a slight increase in activity. Maximum activity, as measured by the isolated muscle technique, was obtained when a chlorine atom was located at position 5 of ring A. The three polysubstituted products (Compounds 16, 17, 18 of Table I) were less active than the parent compound (II).

As would be expected from earlier work (5), an increase in the length of the ethylene side-chain led to less active compounds. Moreover, the substitution of other basic groups for the dimethylamino function resulted in diminished activity.

TABLE II

The Effect of Side Chain Variation on Activity



No.	R ₁	R ₂	Activity
1	H	-CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	2.1
19	H	-CH ₂ CH ₂ NHCH ₃	0.6
20	H	-CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	0.9
21	H	-CH ₂ CH ₂ N	0.3
22	H	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	1.1
23	H	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	1.0
24	H	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ N	0.6
25	H	-CH ₂ C	0.2
26	H	-CH ₂ C H	0.2
27	H	^β -CH-CH ₂ N(CH ₃) ₂ (1) CH ₃	0.05
28	H	-CH ₂ -CHN(CH ₃) ₂ (1) CH ₃	4.4
29	4CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃)N(CH ₃) ₂ (2)	3.5
30	5Cl	-CH ₂ CH(CH ₃)N(CH ₃) ₂ (1,2)	3.2

Branching of the ethylene side-chain had a profound effect on ability to relax histamine induced spasm in the isolated muscle strip. Although attachment of a methyl group to the carbon atom in the *beta* position to the dimethylamino function (Compound 27) destroyed activity, the shift of this methyl group to the *alpha* carbon atom produced the most

(1) The structure of these isomers was established by unequivocal syntheses, the details of which will be published elsewhere.

(2) This compound was prepared by Dr. D. E. MORRISON of these laboratories.

active compound in this series (Compound 28). The combination of the dimethylaminoisopropyl side-chain with the most potent nuclearly substituted phenols, (Compounds 28 and 30), did not produce a summation of activity.

Both the *o*-isopropyl group of FOURNEAU's thymoxyethylene-diethylamine (I) and the *o*-benzyl group of our compound (II) would be expected to increase the basicity of the adjacent oxygen atom. In order to determine whether this increased basicity was of prime importance for high antihistaminic potency, other groups, such as *t*-butyl, cyclohexyl, benzhydryl, and α -naphthylmethyl, which have an effect similar to the benzyl group, were introduced into the position *ortho* to the ether function. All of these compounds had a very low activity. The shift of the *o*-benzyl group to the position *para* to the ether linkage likewise produced an inactive compound.

The final structural modification made was the replacement of the ethereal oxygen by a nitrogen atom and closing of ring. It had been noted that the diphenylmethane portion of Compound I may closely approximate that of a tricyclic ring system. The substitution of a trivalent nitrogen for the oxygen atom of this compound permitted ring closure, yielding N-dimethylaminoethyl-acridan (III) ⁽¹⁾. This compound, conveniently prepared from acridan and dimethylaminoethyl chloride, was found to have an *in vitro* activity of 7.5 times that of benadryl. The structurally similar compound N-dimethylaminoethyl-carbazole was without activity. An investigation of the effect of nuclear substitution and side-chain modifications on the antihistaminic activity of N-dialkylaminoalkylacridans is in progress.

Two compounds in this series were subjected to a detailed pharmacological study. These were the highly active acridan derivative or compound III, and compound 13 of Table I, an active representative of the phenolic ether type.

Histamine Aerosol. — Each of these compounds as the hydrochloride was compared with pyribenzamine with respect to its ability to protect guinea pigs from the lethal effect of a histamine aerosol. The procedure followed was that previously published (4). Compound III was about 1/7 and compound 13 about 1/17 as active as pyribenzamine by this test.

Blood Pressure Effects. — In anesthetized cats, the intravenous injection of these drugs, 1-10 mg./kg., caused a sharp fall in mean blood

⁽¹⁾ This compound has been prepared independently by FREESE, HAMBOURGER and MICHIELS (6).

pressure with slow recovery. The transient depressor responses of small doses of histamine, 0.5 — 1.0 μ g., were completely nullified after the administration of these antihistamines. In contrast, the responses of acetyl- β -methylcholine iodide were unaffected. The blood pressure rise due to the injection of epinephrine was potentiated by compound 13, an action noted with other antihistamine drugs (7). The acridan compound on the other hand depressed the epinephrine response. This has been reported to be true with neohetramine ([2-N-dimethyl-amino ethyl-N-*p*-methoxy benzyl]-amino pyrimidine HCl) (8).

Capillary Permeability. — Since the clinical symptoms of hay-fever are thought to be concerned with capillary permeability changes in the nasal mucosa, these two compounds were studied with regard to their influence on permeability changes caused by histamine. The method used was that described by LAST (9). Both substances exerted a significant inhibitory action on histamine wheals in rabbits' skin when they were injected subcutaneously at a dose level of 20 mg./kg.

Antianaphylactic Effects. — Guinea pigs, sensitized by preliminary injections of horse serum one month in advance, were able to resist the lethal result of challenging doses of the antigen injected by vein if they had been treated one hour previously with either compound 13 or the acridan derivative. This was evidenced by the significantly greater mortality in the untreated control group of sensitized animals in contrast to the antihistamine treated. Effective doses varied from 1 to 10 mg./kg.

Toxicity. — The acute toxicity of these drugs in rats and mice is compared with values previously found (4) for pyribenzamine and benadryl in the following table :

Compound	Animal	Route of Administration	LD ₅₀ \pm S.E. mg./kg.
13	Mouse	i.v.	53.0 \pm 4.0
13	Rat	Oral	1448.0 \pm 129.0
III	Mouse	i.v.	41.1 \pm 1.2
III	Rat	Oral	554.0 \pm 66.0
benadryl	Mouse	i.v.	29.7 \pm 1.67
pyribenzamine	Mouse	i.v.	18.26 \pm 0.6

Rats fed diets incorporating these drugs in concentrations of 0.02, 0.05, 0.1, and 0.2 % in a manner described by ANDERSON (10), survived a 30 day test period. Only the animals on the higher doses gained weight at a slower rate than normal. All animals when necropsied showed no evidence of damage, either grossly or microscopically, indicating that both compounds are well tolerated by rats.

A clinical investigation of these compounds is in progress.

SUMMARY

A study has been made of the effect of substitution, side-chain variation, and other structural changes on the activity of a series of antihistaminic agents derived from diphenylmethane.

The most potent compounds prepared, 2-(β -dimethylaminoethoxy)-5-chlorodiphenylmethane, 2-(β -dimethylaminopropoxy) diphenylmethane and N-dimethylaminoethylacridan had antihistaminic activities of 3.1, 4.5 and 7.5 respectively (benadryl = 1).

The acridan compound and 2-(β -dimethylaminoethoxy)-5-chlorodiphenylmethane were examined in a more detailed fashion. Both counteracted most of the pharmacological responses of histamine and were effective in relieving anaphylactic shock in guinea pigs. In animal tests both compounds were significantly less toxic than pyribenzamine and benadryl.

We wish to acknowledge the invaluable assistance of Dr. P. N. HARRIS, Mr. R. C. ANDERSON and Miss MARILYN MASTERS in the investigations.

REFERENCES

1. — BOVET, D., and STAUB, A. M. *C. R. Société de Biologie*, 1937, 124, 547.
2. — STAUB, A. M. *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, 63, 485.
3. — SMITH, R. R., and BINKLEY, S. B. *Abstracts Am. Chem. Soc. 114th Meeting* 1948, 5K.
4. — LEE, H. M., DINWIDDIE, W. G., and CHEN, K. K. *J. Pharmacol. and Exper. Therap.*, 1947, 89, 83.
5. — LOEW, E. R., KAISER, M. E., and MOORE, V. *J. Pharmacol. and Exper. Therap.*, 1945, 83, 120.
6. — FREEZE, H. B., HAMBOURGER, W. E., and MICHIELS, P. M. *Federation Proceedings*, 1948, 7, 219.
7. — SHERROD, T. R., LOEW, E. R., and SCHLOEMER, H. F. *J. Pharmacol. and Exper. Therap.*, 1947, 89, 247.
8. — SCUDI, J. V., REINHARD, J. F., and DREYER, N. B. *J. Allergy*, 1948, 19, 184.
9. — LAST, M. R., and LOEW, E. R. *J. Pharmacol. and Exper. Therap.*, 1947, 89, 81.
10. — ANDERSON, R. C., HENDERSON, F. G., and CHEN, K. K. *J. Am. Pharm. Assoc., Scientific Edition*, 1943, 32, 204.

INSTITUTO DE FARMACOLOGIA E TERAPEUTICA EXPERIMENTAL
DIRECTEUR : PROF. FELICIANO GUIMARÃES
FACULTÉ DE MÉDECINE DE COIMBRA (PORTUGAL)

ACTION DU CAMPHOSULFONATE DE QUININE SUR LE TRAVAIL CARDIAQUE CHEZ LA GRENOUILLE

PAR

J. LOBATO GUIMARÃES

(Travail reçu le 10-2-1949)

Le camphosulphonate de quinine est, comme on le sait, le sel dérivé de l'action de l'acide camphosulfonique sur la base alcaloïdique — la quinine. Ce sel a, selon quelques auteurs (1), des propriétés pharmacodynamiques intéressantes vu qu'il joint l'action excitante du camphre sur le cœur aux propriétés pharmacologiques de la quinine, dont l'action dépressive sur la fibre cardiaque, connue depuis longtemps, peut ainsi être équilibrée.

L'action du camphre comme analeptique cardiaque a été l'objet de plusieurs études et de vives discussions. On a même nié au camphre toute valeur de stimulant cardiaque. La 24^{me} édition de l'United States Dispensatory signale que, bien que la drogue jouisse en Europe d'une grande réputation comme analeptique dans certaines dépressions cardiaques, sa valeur en clinique, si elle en a une, ne peut être établie que par des études plus précises. Et SOLLMANN écrit, dans la dernière édition de sa Pharmacologie, que l'usage du camphre, pour réanimer le cœur, n'est pas fondé sur des épreuves décisives et qu'il est déconseillé par d'éminents cliniciens. Cependant, ce même auteur note que, sous des conditions expérimentales favorables, le muscle cardiaque déprimé peut être amélioré dans son travail par l'action du camphre, et les arythmies peuvent être supprimées.

Les auteurs européens sont moins catégoriques dans la condamnation du camphre comme analeptique cardiaque. Bien au contraire, plusieurs d'entre eux l'admettent (RICHAUD, VELÁZQUEZ, GADDUM), et préconisent même l'emploi clinique de ce produit.

Dans une révision d'ensemble de l'action pharmacodynamique du

camphre, Jean RÉGNIER et Suzanne LAMBIN (2) concluent que l'expérimentation confirme l'opinion clinique de l'action favorable du camphre sur l'appareil cardio-vasculaire, pourvu que dans l'étude pharmacodynamique on se place dans certaines conditions déterminées : emploi de doses faibles, utilisation d'animaux avec le cœur en déficience fonctionnelle par l'effet de dépresseurs du travail cardiaque, se rapprochant ainsi des conditions cliniques. Finalement, il faut prendre en considération les actions indirectes sur le cœur ou actions extracardiaques du camphre.

L'action analeptique du camphre étant admise, et étant donnés les inconvénients de sa faible solubilité dans l'eau exigeant des solutions huileuses dont l'absorption par l'organisme est lente, on a recherché la possibilité d'utiliser des formes ou dérivés solubles. De là l'emploi des camphosulfonates.

Les sels de l'acide camphosulfonique conservaient, d'après les recherches de plusieurs expérimentateurs, les propriétés pharmacodynamiques du camphre sur le cœur. Ainsi le camphosulfonate de sodium, d'après la vérification de LARDÉ (3), peut vaincre l'arrêt provoqué par le potassium sur le cœur de la grenouille « in situ ». Cette constatation s'accordait avec les résultats obtenus par LÉVY et BEAUNE (4) et ceux de HENRIJEAN et WAUCOMONT (5). Les mêmes résultats sont confirmés par les expériences de RÉGNIER et LAMBIN, qui ont vérifié pour les camphosulfonates de sodium et d'éthylénadiamine la capacité de réanimer les mouvements cardiaques inhibés par le potassium avec l'apparition, en général, d'une augmentation d'amplitude et d'un ralentissement du rythme primitif. Ces auteurs n'ont pas constaté d'appréciables différences entre les divers camphosulfonates expérimentés, mais ils croient que pour obtenir des effets semblables il faut employer des doses plus élevées pour les dérivés du camphre que pour le camphre lui-même (2).

Puisque les propriétés pharmacodynamiques du camphre se vérifiaient pour les dérivés de l'acide camphosulfonique, on pouvait s'attendre à d'intéressantes actions pharmacologiques du camphosulfonate de quinine, car les actions de la quinine doivent logiquement s'ajouter aux actions toniques du camphre.

L'action du camphosulfonate de quinine sur le cœur de la grenouille a été vérifié par RUIZ GIJÓN et CENTENERA (6), qui ont étudié ses effets en employant la perfusion du cœur par la méthode de CLARK, en mesurant le volume-minute par la technique utilisée par BÜLBRING (7), et encore en faisant des observations électrocardiographiques. Comparant les actions du chlorhydrate et du camphosulfonate de quinine, les auteurs arrivent à la conclusion que ce dernier l'emporte sur le chlorhydrate par son action plus homogène sur le myocarde, par une toxicité moindre

et une compensation plus rapide de ses effets. D'après les mêmes auteurs la fréquence cardiaque ne se rétablit pas si rapidement avec le Csq (on abrégera ainsi désormais, à l'exemple de GIJÓN, la désignation du camphosulfonate de quinine) qu'avec le chlorhydrate de quinine, ce qui peut être expliqué par l'action du camphre venant s'ajouter à celle de la quinine. Cette circonstance aurait un intérêt tout spécial pour les cas de perturbations du rythme dans lesquelles on emploie la quinine.

L'action antifibrillante et régulatrice du rythme cardiaque de la quinine est renforcée dans le Csq par le camphre qui, d'après quelques auteurs, a également des propriétés antifibrillantes. Ainsi RÉGNIER et LAMBIN (2), déjà cités, disent qu'on peut considérer suffisamment prouvée l'action inhibitrice du camphre sur les fibrillations cardiaques, comme le confirment les travaux d'auteurs divers, p. ex. ceux de BORUTTAU (expériences avec des animaux à sang chaud) et de GROSSMANN (qui utilisa des cœurs de grenouille). Ces résultats sont toutefois contredits par les expériences de VAN DONGEN (8), qui nie l'action antifibrillante expérimentale du camphre. Selon RÉGNIER et LAMBIN cette action est difficile à comprendre si l'on admet que les fibrillations cardiaques sont dues à une augmentation de l'excitabilité cardiaque, mais elle s'interprète facilement lorsque l'on admet la notion d'une stimulation cardiaque par le camphre, et si nous admettons avec DE BOER, FRÖLICH et GROSSMANN, que ces fibrillations cardiaques sont dues à un état d'épuisement relatif du cœur.

Les pneumonies fourniraient une autre occasion pour l'emploi du Csq. Dans ces cas, l'action stimulante du camphre sur le cœur et sur la respiration, tout en améliorant la petite circulation par dilatation des vaisseaux coronaires, et par stimulation centrale de la respiration, s'ajouterait à l'action antipneumococcique bien connue de la quinine.

Comme le pH influence les conditions du travail cardiaque, ce que SCHMELEW (9) a étudié en particulier pour les cas de l'action du camphre sur le cœur de la grenouille, RUIZ GIJÓN et CENTENERA ont étudié les modifications du pH dans les solutions de Csq employées dans leurs expériences et ils ont trouvé des différences si petites dans la valeur du pH , par rapport au soluté de RINGER, qu'on peut les négliger.

EXPÉRIENCES — TECHNIQUE

Dans nos expériences, nous avons étudié l'action du Csq sur le volume-minute du cœur de la grenouille perfusé « in situ » avec du liquide de RINGER, et en faisant usage du dispositif décrit par VELÁZQUEZ,

BAYO et FIGUERAS (10) permettant l'enregistrement graphique du vol.-min. sans avoir à le mesurer constamment comme ce serait le cas si l'on employait la technique que BÜLBRING a décrite (7).

Ce procédé consiste à faire la perfusion du cœur de la grenouille avec du liquide de RINGER, que l'on fait entrer par une canule communiquant avec la veine cave, un peu avant le sinus veineux, et qui sort par l'aorte gauche, la droite ayant été liée. Le liquide passe dans une autre canule, traverse un dispositif où l'on peut faire varier la résistance périphérique, pour être finalement reçu dans un tube en verre, dont la base s'ouvre chaque minute, grâce à un interrupteur électrique automatique. A l'intérieur de ce tube en verre se déplace un flotteur ayant des encoches par où passe le liquide, et muni d'une tige où est fixé un stylet inscripteur. A la canule afférente de la veine cave est adapté un robinet en verre à deux entrées permettant la communication avec l'un ou l'autre des deux récipients à hauteur réglable où se trouvent le liquide de RINGER et la solution à étudier.

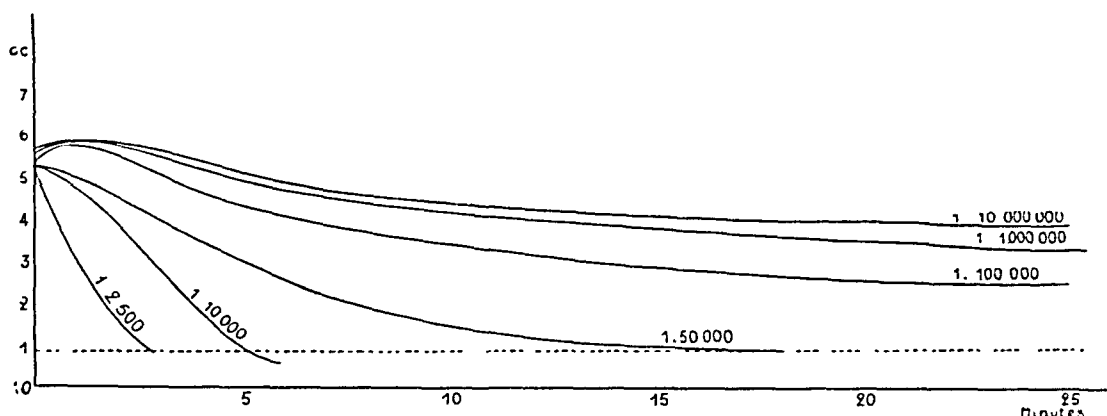
On réalise ainsi, on le voit, un dispositif analogue à celui de Starling pour les animaux à sang chaud, et dans lequel on peut faire varier la pression d'afflux au cœur, et aussi les résistances périphériques, facteurs importants dans l'étude du travail cardiaque.

La hauteur du récipient qui contient la solution de RINGER ou la solution à étudier, hauteur qui indique la pression d'afflux, et la hauteur de l'eau dans le tube, qui donne la mesure des résistances périphériques, étaient toujours réglées de façon à obtenir le maximum de rendement cardiaque, réglage qu'on ne réussit qu'avec une certaine pratique. On peut dire, toutefois, qu'en moyenne on employait une hauteur de 5 centimètres pour le niveau supérieur du liquide de perfusion (différence entre ce niveau et la canule d'entrée dans la veine cave), hauteur qui donne la mesure de la pression d'afflux, et on employait une pression d'eau de 3 à 4 centimètres pour les résistances périphériques. Ces deux facteurs (pression d'afflux et résistances périphériques) étaient maintenus constants pendant la durée de chaque expérience, et dans ce but on pouvait régler la hauteur des récipients contenant le liquide de perfusion, comme il a été dit.

Chaque systole cardiaque envoie dans la burette (ou tube en verre à l'intérieur duquel se déplace verticalement le flotteur) un volume de liquide correspondant au volume systolique, et qui fait monter proportionnellement le flotteur. Comme le cylindre enregistreur poursuit son mouvement, le stylet décrit un trait horizontal correspondant à la diastole, puisque pendant la durée de celle-ci aucun liquide ne passe plus à la burette. Il en résulte une ligne montant en gradins jusqu'à

ce que, à la fin d'une minute, l'ouverture de la base de la burette provoque le vidage brusque et oblige le stylet, qui a atteint le haut de l'escalier du graphique, à décrire une ligne verticale de descente, initiant immédiatement une nouvelle ascension.

On peut donc étudier, en observant les graphiques résultant de l'inscription du stylet sur le papier noirci du cylindre, en plus du vol.-min., donné par la hauteur du graphique, le volume systolique, repré-



GRAPH. I

Marche de l'action du camphosulfonate de quinine sur le cœur de la grenouille. Volumes-minutes obtenus à partir du commencement de l'action du camphosulfonate de quinine, dilué dans du soluté de Ringer, aux concentrations indiquées.

(Le trait interrompu horizontal indique le vol.-min. donné par l'écoulement passif du liquide pour la même pression d'afflux des expériences).

senté par la hauteur de chaque marche de l'escalier décrit, la durée de chaque diastole, constatée par l'extension du plateau horizontal de chaque gradin, et aussi la fréquence cardiaque, ou nombre de marches d'escalier, c'est-à-dire, de systoles par minute.

Il est évident que la relation entre la hauteur d'un gradin et l'extension de sa partie horizontale dépend aussi de la vitesse du cylindre sur lequel le graphique est enregistré. La vitesse choisie nous semble être la plus convenable en notre cas.

Nous avons utilisé une solution de RINGER ayant la composition suivante :

Cl_2Ca	—	30 centigrammes
ClK	—	20 centigrammes
CO_3HNa	—	15 centigrammes
ClNa	—	6 grammes
Pour un litre d'eau distillée.		

Les dilutions employées ont varié de 1/2.500 à 1/10.000.000. La *Rana esculenta* a été utilisée, en choisissant de préférence les grenouilles de poids supérieur à 50 grammes, vu que les animaux les plus gros donnent un meilleur vol.-min.

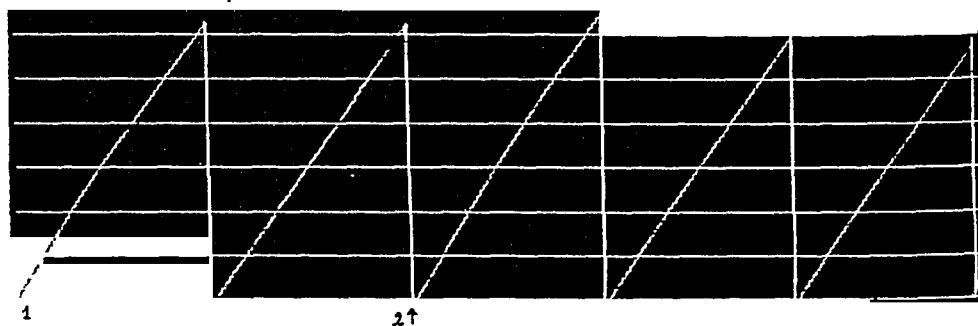
Les expériences ont été effectuées aux mois de septembre et d'octobre.

Le Csq utilisé a été aimablement cédé de Madrid par le Prof. RUIZ GIJÓN. La même substance a été employée par cet auteur dans le travail cité. C'est le produit cristallisé préparé par la maison Abello avec les caractéristiques suivantes : substance cristallisée en aiguilles, très soluble dans l'eau et l'alcool, insoluble dans l'éther et dans la plupart des dissolvants des graisses, de saveur amère. Les solutions dans l'eau donnent la fluorescence bleue de la quinine, et ont une réaction légèrement acide au papier de tournesol. Point de fusion 210° C.

RÉSULTATS

Le graphique I montre les courbes de la marche de l'action du Csq sur le vol.-min. du cœur de la grenouille. En ordonnée s'inscrivent les centimètres cubes atteints par le vol.-min., en abscisse le temps en minutes à partir du commencement de l'action du soluté de Csq.

Chaque courbe représente la marche de l'action pour une certaine dilution, et traduit la moyenne des valeurs obtenues pour cette dilution,



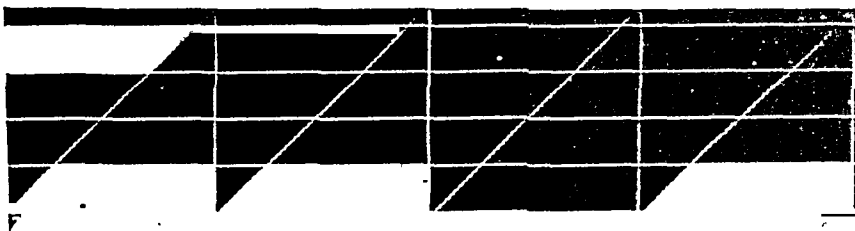
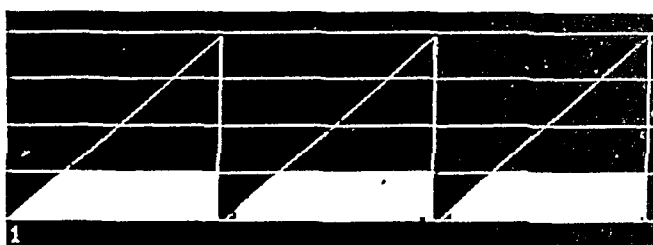
GRAPH. II

1. Perfusion avec du Ringer. 2. Perfusion avec du Csq dilué à $1/100.000$ dans du Ringer.

puisque plusieurs déterminations ont été faites pour chaque concentration. La variation du rendement cardiaque sous l'action de diverses concentrations du médicament peut de cette façon être observée, le travail cardiaque étant mesuré par le vol.-min. circulatoire.

D'après ce graph. I, ce n'est que pendant les premières minutes d'application du Csq et rien qu'avec des dosages très faibles (moins

de $1/100.000$) qu'on peut vérifier une légère excitation, c'est-à-dire, une légère augmentation du vol.-min. (GRAPH. II, 2). En continuant la perfusion, on voit surgir une action dépressive caractérisée par une diminution du vol.-min., qui s'accroît progressivement. L'excitation est très petite et fugace. Elle est d'ailleurs inconstante. (Nous nous référons à des cœurs normaux, c'est-à-dire, n'ayant pas été déprimés avant l'action du Csq).



GRAPH. III

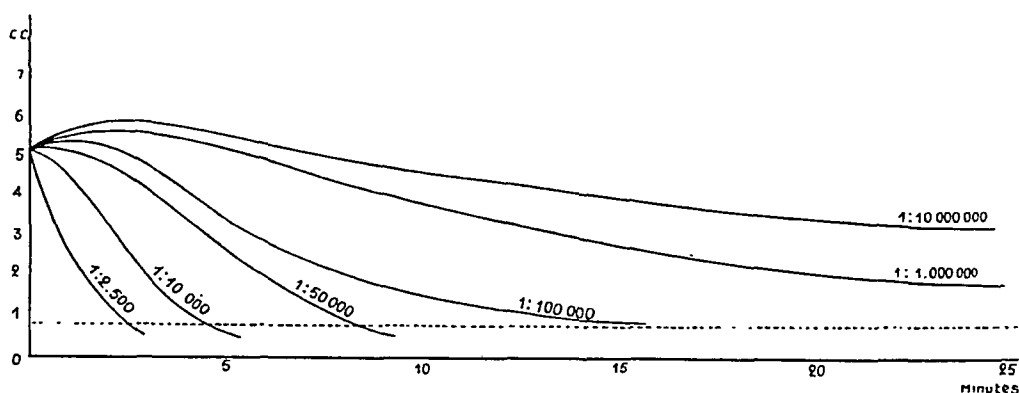
1. 15 minutes après perfusion avec une solution de Csq à $1/10.000.000$ dans du Ringer.
2. (Cont.) 30 minutes après le Csq.

Avec des concentrations plus fortes, l'action initiale excitante n'apparaît guère, et la dépression s'accuse dès le commencement.

La baisse du rendement cardiaque est d'autant plus rapide que la concentration est plus forte, comme l'indiquent les courbes du graphique I.

L'abaissement du vol.-min. circulatoire s'accompagne d'une diminution de la fréquence cardiaque (action chronotrope négative). Cependant cette bradycardie n'est pas suffisamment intense pour expliquer toute la diminution du vol.-min. Cette diminution se fait principalement aux frais du volume systolique. En effet, on vérifiait qu'aux premières phases de l'action, la systole était énergique parce qu'il y avait une diastole prolongée, mais un peu plus tard l'intensité de la contraction subissait, elle aussi, l'action dépressive de la quinine. La baisse du rendement cardiaque est donc due principalement à une action sur le pouvoir de contraction (action inotrope négative). Ce fait est surtout visible aux fortes concentrations (GRAPH. I).

Si nous comparons la marche de l'action sur le vol.-min. circulatoire chez la grenouille du Csq et du sulfate de quinine en égales concentrations, nous pourrions vérifier que le sulfate de quinine provoque un abaissement plus rapide du rendement cardiaque quand il s'agit de concentrations faibles. A des concentrations fortes (1/10.000) le Csq provoque la même chute de vol.-min. ou même accélère la chute. Ceci peut être confirmé par l'observation parallèle du Graph. I et du graphique que nous avons obtenu (II) en étudiant l'action de la quinine sur le vol.-min. de la grenouille (GRAPH. IV).



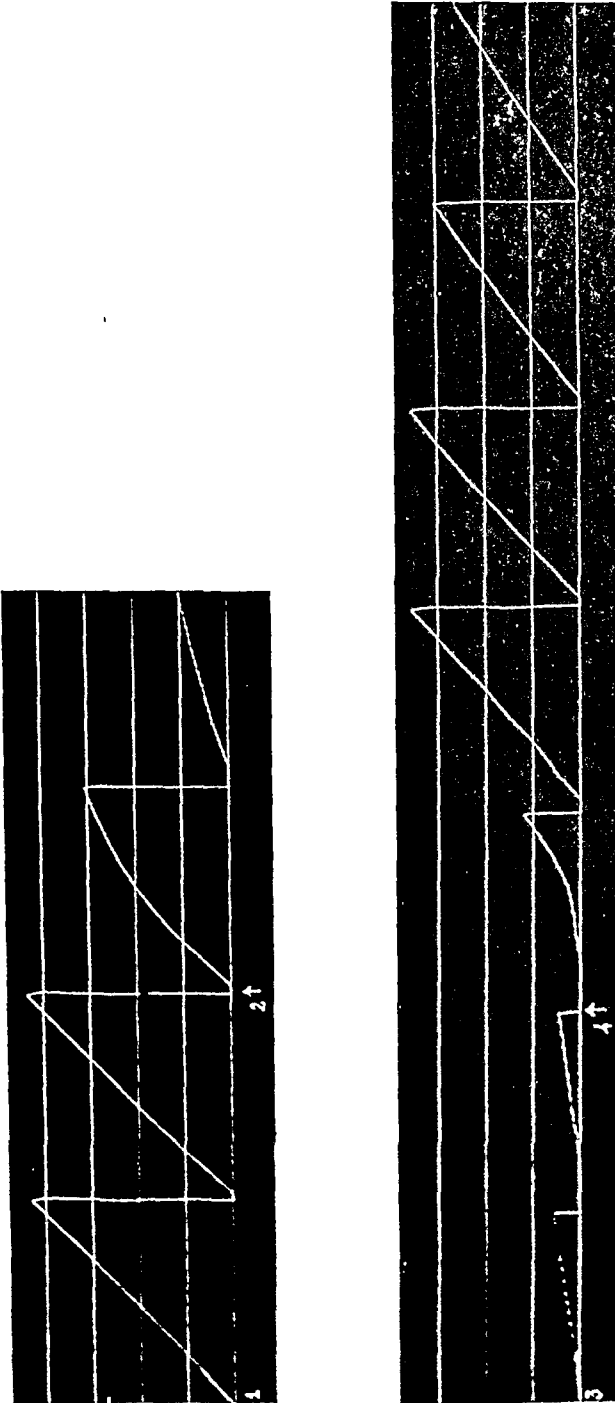
GRAPH. IV

Marche de l'action du sulfate de quinine sur le cœur de la grenouille. Volumes-minutes obtenus à partir du commencement de la perfusion au sulfate de quinine, dilué dans du Ringer, aux concentrations indiquées. Le trait horizontal interrompu indique le volume-minute donné par l'écoulement passif du liquide pour la même pression d'afflux des expériences (*V. Farmacoter. Act.*, V, 1948, Juil., n° 49, pgs. 469).

Si, après l'action du Csq, nous faisons à nouveau traverser le cœur par du liquide de RINGER dépourvu de tout médicament, le vol.-min. augmente à nouveau, sans toutefois atteindre, en règle générale, son niveau initial. Pareillement à ce que nous avons trouvé pour la quinine, l'intensité et la vitesse de récupération cardiaque varient en raison inverse de la concentration et de la durée de l'action du Csq. Mais en comparant sous ce rapport le sulfate de quinine et le Csq, nous avons vérifié que la récupération cardiaque par rinçage au RINGER sans le médicament est plus facile pour le Csq que pour le sulfate, à concentration égale, s'il s'agit de solutés assez faibles, mais elle est analogue ou même plus difficile pour les fortes concentrations, ce qui s'accorde avec les graphiques sur la marche de l'action de ces drogues sur le vol.-min., ainsi qu'il a été dit.

Dans quelques cas, on vérifie aussi que le cœur, sous l'action prolongée

du Csq, après avoir par conséquent subi son action dépressive, et en continuant d'être sous l'effet du médicament, augmentait à nouveau spontanément son vol.-min., bien que cette augmentation fut peu intense.



GRAPH. V

1. Perfusion avec du Ringer. 2. Perfusion au Ringer préparé avec le double de la quantité normale de CLK.
3. (Cont.) Quelques minutes après. 4. Perfusion avec Csq dilué à 1/100.000 dans du Ringer préparé avec le double de la quantité normale de CLK.

On constatait ainsi une sorte d'accoutumance au toxique. C'est ce qu'on peut voir sur le Graph. III en 1 et 2. Le même fait a été par nous vérifié pour le sulfate de quinine (II).

En étudiant maintenant l'action du Csq sur des cœurs de grenouille qui ont subi une action pharmacologique dépressive on vérifie un effet très net d'excitation avec augmentation du vol.-min. sur des cœurs intoxiqués par l'action du potassium. A condition que la dépression cardiaque causée par l'emploi du K n'ait pas été trop prolongée, ce qui ne permettrait pas au cœur de réagir à nouveau en empêchant l'augmentation du vol.-min. par l'action du Csq, ce médicament fait hausser le vol.-min., augmentant le rendement du travail d'un cœur de grenouille au préalable déprimé par le potassium. Il y a une première phase d'excitation nette, suivie d'une phase de dépression si l'on prolonge l'action du Csq. Cette constatation est d'accord avec ce qu'ont trouvé RUIZ GIJÓN et CENTENERA (6), qui attribuent la première phase — l'excitation — à l'action du camphre, et la dépression consécutive à l'action de la quinine. Le Graph. V nous montre ce comportement du Csq.

Si dans le soluté de RINGER nous faisons varier non plus le potassium, mais le calcium, nous vérifions que la diminution du pourcentage de ce cation accentue l'action dépressive du Csq de façon analogue à celle que nous avons déjà vérifiée pour la quinine (11). Inversement, l'augmentation du pourcentage du Ca rend l'excitation initiale du Csq plus accusée pour les faibles concentrations (mais rien que pour celles-ci), en ajoutant à l'excitation du Csq celle du Ca, rendant aussi moins accusée la dépression consécutive.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Nous avons fait la détermination expérimentale de l'action du camphosulfonate de quinine sur le volume-minute du cœur de grenouille (*Rana esculenta*) en employant la technique de VELÁZQUEZ et FIGUERAS, avec des cœurs isolés « in situ » et perfusés avec du Csq dilué dans du soluté de RINGER. Nous avons obtenu les résultats suivants :

A. — Cœurs normaux.

1) Le Csq a une action dépressive sur le vol.-min. d'autant plus rapide et accusée que la concentration est plus forte. (GRAPH. I). La perfusion consécutive au RINGER sans substance toxique fait augmenter à nouveau le vol.-min., et cette récupération sera d'autant plus facile que la durée et l'intensité de l'action du Csq auront été plus faibles.

2) Nous avons constaté parfois une petite excitation initiale (GRAPHS. I et II), mais cette augmentation initiale du vol.-min. était inconstante

et toujours fugace, n'ayant lieu que pour les solutions très diluées (moins de 1/100.000).

3) La dépression du vol.-min. causée par le Csq est due à la bradycardie provoquée par le médicament (action chronotrope négative), mais surtout à la diminution de l'énergie de contraction (action inotrope négative du Csq).

4) Comparant l'action du Csq avec celle du sulfate de quinine à concentrations égales, nous avons vérifié que le Csq est moins dépressif pour les faibles concentrations, mais qu'il est tout aussi dépressif, ou même plus, pour les fortes concentrations (GRAPHS. I et IV). La récupération du vol.-min. par rinçage au RINGER sans médicament est également plus facile pour le Csq que pour le sulfate de quinine, à l'exception des fortes concentrations.

5) Parfois, au cours de l'action dépressive du Csq, le vol.-min. qui allait en diminuant, subissait une légère augmentation, traduisant ainsi une sorte d'accoutumance au toxique (GRAPH. III).

B. — *Cœurs ayant souffert une action dépressive par le K.*

6) On vérifie que le Csq dilué au 1/100.000 a un effet d'excitation nette, augmentant le vol.-min. (GRAPH. V). Cette action n'a lieu que quand l'intoxication par le potassium n'a pas été trop accusée.

C. — *Action du calcium.*

7) L'augmentation de la proportion de Ca dans le soluté de Ringer atténue l'action dépressive du Csq aux faibles concentrations : inversement, la diminution du Ca accentue cette action de dépression.

BIBLIOGRAPHIE

1. — DELIO FUSCO. *Boll. Chim. Farmac.*, 1935, 76, 585.
2. — JEAN RÉGNIER et SUZANNE LAMBIN. Contribution à l'étude pharmacodynamique du camphre et de divers camphosulfonates, *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1941, 48, 166.
3. — R. LARDÉ. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 113, 1011.
4. — JEANNE LÉVY et A. BEAUNE. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1932, 39, 217.
5. — M. HENRIJEAN et M. WAUCOMONT. *Bull. Ac. Roy. Méd. Belg.*, 1930, V. S., 10, 416.
6. — J. RUIZ GIJÓN et D. CENTENERA. Die Wirkung der Chinin-Camphosulfosäure auf das Froschherz, *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 1942, 199, 89.

7. — E. BÜLBRING. *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 1930, 152, 257.
8. — K. VAN DONGEN. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1936, 54, 252.
9. — K. A. SCHMELEW. *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 1930, 158, 65.
10. — B. L. VELÁZQUEZ, J. M. BAYO BAYO, D. FIGUERAS AYMERICH et M. DE LA MATA. Volumen minuto. Nueva tecnica para su registro gráfico en el corazón de la rana. *Trabajos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas*, 1945, 4, 143.
11. — J. LOBATO GUIMARÃES. *Farmacoter. actual*, 1948, 5, 49, 465.

TRAVAIL DES LABORATOIRES DE RECHERCHES PHARMACEUTIQUES DE LA
SOCIÉTÉ DES USINES CHIMIQUES RHONE-POULENC (FRANCE)

RECHERCHES SUR LES POISONS CURARISANTS DE SYNTHÈSE

I^{re} Partie

Bis-quinoloxo-alkanes et Bis-aminophénoxy-alkanes (1)

PAR

DANIEL BOVET (2), SIMONE COURVOISIER, RENÉ DUCROT
ET RAYMOND HORCLOIS

(Travail reçu le 30-1-1949).

INTRODUCTION

Au cours des quinze dernières années un grand nombre de recherches ont été réalisées qui confèrent aux problèmes inhérents aux curares une singulière actualité (3). C'est en 1935, l'établissement par KING de la formule chimique d'un constituant actif du curare en tube, la *d*-tubocurarine. C'est en 1936 la reconnaissance due en particulier à l'école anglaise, par DALE, FELDBERG et VOGT, du rôle de l'acétylcholine dans la transmission neuromusculaire, qui a permis de fixer l'appartenance des poisons de ce type au groupe des substances cholinergiques. Ce sont enfin les observations de WIELAND, PISTOR et WITKOP (1937-1941), de CARNEIRO (1938-1939) et de KARRER et SCHMIDT (1946-1947) qui ont réussi à isoler à partir de différentes espèces végétales sud-américaines une pléiade d'alcaloïdes dont l'identité avec les constituants des curares indiens a pu être solidement établie.

(1) Notes préliminaires : *C. R. Ac. Sc.*, 1946, 223, 597 et 1947, 224, 1733.

(2) Adresse actuelle : Laboratorio di Chimica Terapeutica, Istituto Superiore di Sanità, Roma (Italie).

(3) On consultera sur les principes actifs du curare et les poisons curarisants les travaux d'ensemble suivants récemment parus :

BOVET, D. et BOVET-NITTI, F. Structure et activité pharmacodynamique des médicaments du système nerveux végétatif, Karger, Bâle, 1948.

BOVET, D. et BOVET-NITTI, F. *Experientia*, 1948, 4, 325.

CRAIG, E. L. *Chem. Rev.*, 1948, 42, 285.

McINTYRE, A. Curare, its natural history and clinical use, University Chicago Press, Chicago, 1947.

En 1941-43 l'isolement de la *d*-tubocurarine à partir d'une Menispermacée, le Chondodendron tomentosum, par WINTERSTEINER et DUTCHER, mit entre les mains des expérimentateurs tant physiologistes que cliniciens un alcaloïde chimiquement pur d'activité constante.

En thérapeutique, les travaux les plus marquants ont été réalisés en Angleterre par WEST (1935), et aux États-Unis par BENNETT (1941). L'application de la *d*-tubocurarine à l'anesthésie chirurgicale par GRIFFITH et JOHNSON (1942) et CULLEN (1943) a ouvert aux applications des curares un champ d'applications particulièrement important.

Nous nous sommes alors demandé si, en prenant comme modèle celui qu'offrait la structure de la *d*-tubocurarine nous ne pourrions pas aboutir à la synthèse de dérivés doués de propriétés analogues.

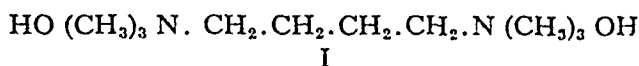
En dehors des alcaloïdes naturels de différentes espèces végétales, appartenant aux familles des Menispermacées, des Loganiacées et des Papilionacées, des propriétés pharmacodynamiques analogues à celles du curare ont été signalées dans de nombreuses molécules simples, en particulier dans des sels d'ammonium quaternaires.

Aucun des produits de synthèse connus ne présentant, chez les mammifères, une activité curarisante susceptible de se prêter aux investigations pharmacodynamiques et aux applications thérapeutiques, nous avons abordé l'étude de substances nouvelles dont la constitution devait tenir compte à la fois du modèle qu'offrait la *d*-tubocurarine naturelle, et des relations entre structure et activité qu'il était possible de tirer des travaux de nos prédécesseurs.

Les recherches sur les curares de synthèse susceptibles de recevoir une application thérapeutique posent un problème déjà ancien, puisque en 1869 déjà, CRUM-BROWN (1), dans un mémoire sur l'activité curarisante des sels d'alcaloïdes à fonction ammonium quaternaires, entrevoyait la possibilité d'utiliser chez l'homme le sulfate de méthylstrychnine, le sulfate de méthyl-brucine et le sulfate de méthylthébaine. L'étude du iodométhylate de strychnine a été souvent reprise; CHASE (2) a récemment encore entrepris avec succès l'étude des chloro-alkylates de quinine, et SÉVIN (3) celle du iodométhylate de spartéine. La voie ouverte par CRUM-BROWN sans avoir été complètement abandonnée n'a pas fourni les résultats qu'on pouvait en attendre.

Ce sont en réalité WILLSTAETTER et HEUBNER (4) qui en 1907 ont les premiers attiré l'attention sur l'intérêt présenté par les bases dont la molécule comporte deux fonctions ammonium quaternaires, en décrivant l'activité curarisante pour la grenouille et pour le lapin, sur lequel

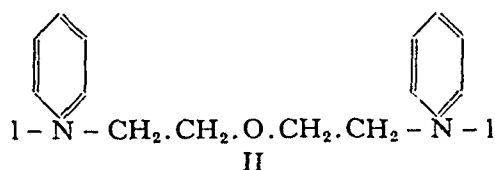
il agit à la dose de 60 mg/kg., de l'hydrate de tétraméthylène bis-triméthylammonium (I).



Après lui, BERLIN (5) et ACKERMANN (6) ont constaté que les sels d'éthylène bis-triméthylammonium, de triméthylène bis-triméthylammonium et de pentaméthylène bis-triméthylammonium exerçaient également une faible activité curarisante sur la grenouille (1).

ROHMANN et ZIETAN (7) en 1938 ont entrepris de nouvelles recherches dans ce domaine en préparant et en examinant l'activité curarisante de dérivés pyridiniques.

Le plus actif des produits décrits (II) paralyse la grenouille à une

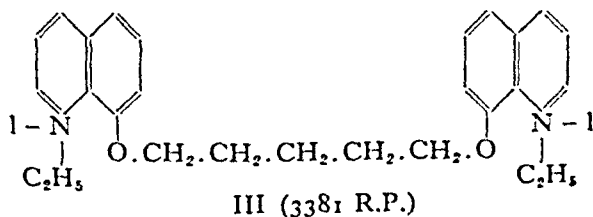


dose de 10 mg. correspondant à environ 250 mg/kg.; le renforcement de l'activité curarisante de la pyridine est donc très faible.

On ne trouve dans aucun des travaux des différents auteurs une vue d'ensemble qui permette de poser dans sa généralité la problème des rapports qui lient dans ce groupe l'activité pharmacodynamique à la structure moléculaire.

Dans nos propres recherches poursuivies en 1946 et en 1947 et qui ont fait à cette date l'objet de notes préliminaires, nous avons parcouru trois étapes successives.

1) Dans la première (8), nous avons reconnu l'activité élective du di-iodoéthylate de bis-(quinoléxyloxy-8')-1,5 pentane (3381 R.P.), et d'autres dérivés dont les molécules comportaient deux noyaux quino-



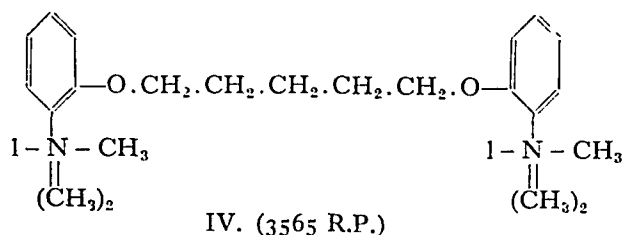
léiniques et isoquinoléiniques à fonction ammonium quaternaire suivant un plan qui, dans notre pensée, évoquait celui de la *d*-tubocurarine.

(1) Dans deux notes récentes, R. B. BARLOW et H. R. ING (*Nature*, 1948, 16, 718) et W. D. M. PATON et E. J. ZAIMIS (*Nature*, 16, 718) ont signalé l'action curarisante intense que manifestent les termes supérieurs de la série des sels de polyméthylène bis-triméthylammonium.

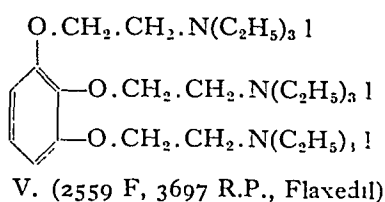
Le composé 3381 R.P. auquel nous sommes parvenus, représente le premier dérivé de synthèse dont l'activité curarisante se manifeste sur les mammifères avec une électivité comparable à celle des alcaloïdes naturels du curare.

2) La suite de nos recherches (9) nous a permis de constater que le noyau quinoléiniques qui entrait dans la molécule du 3381 RP n'était pas indispensable à l'activité de la molécule.

Nous avons orienté nos synthèses dans la voie des produits obtenus par condensations des aminophénols avec les dibromoalkanes, et retenu particulièrement de notre étude le di-iodométhylate de bis-(diméthyl-amino-2'-phénoxy)-1,5-pentane (3565 R.P.), à la fois plus actif et plus toxique que le précédent.



3) Enfin, dans une troisième voie, l'un de nous, en collaboration avec F. DEPIERRE et Y. DÉ LESTRANGE (10) a reconnu l'action sur le muscle strié des éthers-oxydes que forment les polyphénols avec la choline et les amino-alcools homologues. On verra que nous nous sommes plus particulièrement arrêtés à l'étude du tri-iodure de tri-(β -triéthyl-ammoniuméthoxy) 1,2,3-benzène.



Nous suivons le même ordre dans l'exposé qui suit.

TECHNIQUES

A la suite des recherches de CLAUDE BERNARD, de VULPIAN et de KOLLIKER, l'appellation de « poisons curarisants » a été attribuée à un grand nombre de substances qui abolissent toutes l'action des nerf moteurs sur les muscles volontaires. Ayant utilisé comme animal d'expérience la grenouille qui offre une sensibilité particulière vis-à-vis des poisons de ce type, et les préparations neuro-musculaires comme

méthode d'investigations, les physiologistes en sont venus à classer dans le groupe des curares un nombre important de poisons qui n'offrent entre eux que peu de rapports.

A l'heure actuelle — et il est certain que l'introduction des curares en thérapeutique ne fera que confirmer ce point de vue —, le groupe des composés dont les propriétés peuvent être comparées à celles des curares apparaît comme beaucoup plus restreint. On le limitera d'une part aux seules substances dont l'effet sur la transmission neuro-musculaire apparaît lié à l'antagonisme qu'elles exercent vis-à-vis de l'acétylcholine; d'autre part aux substances dont l'action sur la musculature striée apparaît dans une certaine mesure spécifique.

Autant que la paralysie de la transmission neuro-musculaire, l'absence de réactions secondaires importantes — centrales en particulier, ou cardiovasculaires — servira à caractériser les membres du groupe des « substances curarisantes ».

Les considérations qui précèdent expliquent suffisamment pourquoi nous n'avons réalisé que peu d'expériences sur la grenouille bien que celle-ci ait pendant presque 100 ans paru l'animal de choix pour l'étude du curare.

Nous avons jugé en effet que seule l'expérimentation sur les mammifères permettait à la fois de reconnaître la curarisation par l'enregistrement simultané des mouvements respiratoires et des contractions provoquées par l'excitation électrique du muscle gastrocnémien et d'analyser avec soin les manifestations centrales et vasomotrices susceptibles d'accompagner l'intoxication des muscles volontaires.

Dans les essais réalisés tant sur le chien chloralosé que sur le lapin, nous avons souvent mis à profit le fait qu'un courant d'oxygène pur, amené par une sonde fine à travers le trachée jusqu'au niveau des grosses bronches, suffisait en dehors de tout mouvement mécanique du thorax à assurer une hématoxe suffisante.

Le classement des produits a été établi en déterminant leur toxicité par voie i.v. pour le lapin et en utilisant la technique préconisée par HOLADAY (11) (head-drop method), méthode qui si elle n'est aucunement spécifique, n'en permet pas moins de fixer avec une assez bonne précision la relaxation musculaire.

Dans une seconde série d'essais, pour nous assurer du caractère électif de la curarisation obtenue, nous avons systématiquement recherché les réactions présentées par le lapin soumis à la respiration artificielle.

TILLIE en 1890 (12) reprenant les essais de BRODIE avait déjà montré qu'il était dans ces conditions possible d'injecter au lapin une dose de curarine 25 fois supérieure à la dose normalement toxique. Nous avons

pour notre part constaté que le même animal tolère, lorsqu'on assure une ventilation pulmonaire convenable, plus de 200 fois la dose normalement toxique de *d*-tubocurarine.

L'expérience, parcequ'elle est d'une réalisation particulièrement facile, permet aisément la comparaison de différents produits.

L'essai permet également de s'assurer de la durée des effets des différents termes de la série; la curarisation dure environ 1 h. 30 à la suite d'une injection unique de 10 doses paralysantes de *d*-tubocurarine; elle se prolonge 6 h. après l'administration de 50 doses.

Nous avons systématiquement noté le temps nécessaire à la réapparition des premiers mouvements spontanés chez le lapin soumis à la respiration artificielle qui recevait 10 doses toxiques des produits de synthèse.

La respiration le plus souvent était assurée par une pompe à respiration type PALMER, au moyen d'une canule trachéale; une suture de la trachée et de la peau à la fin de l'essai permet d'assurer une survie indéfinie à l'animal d'expérience. D'autres techniques, en particulier l'introduction dans les voies respiratoires d'une sonde fine traversée par un courant d'oxygène, ou l'utilisation de l'appareil de LEGROUX (13) qui repose sur le principe du poumon d'acier ont été également utilisées avec succès.

I. — DI-iodoéthylate de BIS(QUINOLÉYLOXY-8',8'') 1,5-PENTANE (3381 R.P.) (formule III, p. 102)

On prépare le 3381 R.P. en condensant le dibromo-1,5 pentane avec la 8-oxyquinoléine en présence de soude, dans l'alcool. Le 8', 8''-diquinoléyloxy-1,5-pentane est transformé en ammonium quaternaire par chauffage avec l'iodure d'éthyle. Le produit est purifié par la recristallisation dans l'eau. Le di-iodoéthylate de 8',8''-diquinoléyloxy-1,5-pentane (3381 R.P.) cristallise en aiguille jaune d'or, avec trois molécules d'eau. Il fond au bloc Maquenne vers 105°-106° (fusion instantanée), puis il se resolidifie en perdant son eau de cristallisation et fond alors à 208°-209°. Le produit séché à 100° perd son eau de cristallisation et fond directement à 208°-209°.

Le 3381 R.P. est soluble dans l'eau à 0,5 % à 20° et à 7 % à 100°. Il est facilement soluble dans la méthylacétamide diluée (à 20 % d'eau).

L'étude physiologique a été poursuivie parallèlement sur la grenouille, la souris, le lapin et le chien.

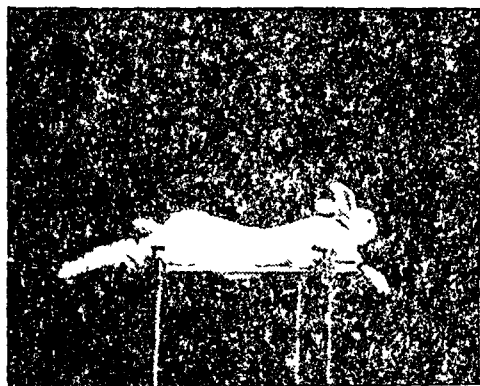
Toxicité

Le iodo-éthylate de quinoléyloxy-pentane provoque, chez la grenouille déjà, les symptômes caractéristiques de l'intoxication curarique.

A la suite d'une injection, dans le sac lymphatique, de 10 mg/kg., les premiers signes de parésie musculaire apparaissent; l'absence complète de réactions s'observe après une dose de 25 mg/kg.



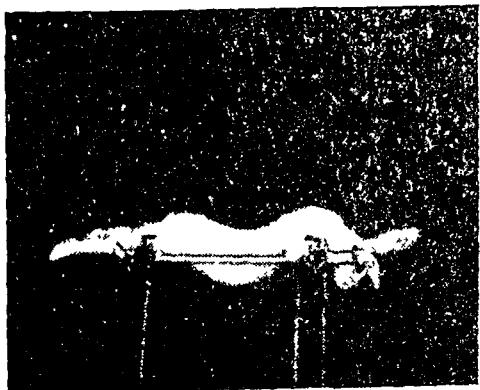
1



2



3



4

FIG. 1

Action du 3381 R.P. sur le lapin — Réaction head-drop

1 et 2 — Animal normal.

3 et 4 — Effet de l'injection i.v. d'une dose de 0,5 mg/kg. de 3381 R.P. On voit la relaxation complète des muscles du cou, des pattes, de la queue et de la paroi abdominale s'établir nettement dans cet essai à une dose de produit qui permet encore la survie sans qu'il soit nécessaire de mettre la respiration artificielle en jeu.

Une quantité dix fois supérieure à la dose curarisante, 250 mg/kg., provoque une paralysie qui paraît être irréversible dans la majorité des cas, la mort survenant après 5 à 6 jours, avant l'élimination totale du produit.

Pour une dose de 50 mg/kg., l'absence de mouvements spontanés et la disparition des réflexes s'établissent en 30 minutes et durent 5 à

8 heures. Dans le même temps on observe sur la préparation neuromusculaire sciatique-gastrocnémien une diminution importante de l'amplitude des contractions musculaires; la paralysie totale ne s'installe qu'avec un certain retard par rapport à l'absence des réactions de l'animal soumis aux excitations réflexes.

Chez le lapin, les premiers signes de curarisation, le relâchement de la musculature de la nuque caractéristique de la « head-drop » réaction qui a permis à HOLADAY de réaliser un dosage biologique de l'activité des alcaloïdes du curare, apparaissent à la suite de l'injection de 0,25 mg/kg. de 3381 R.P. Une hypotonie plus marquée débutant par les membres postérieurs et qui entraîne finalement une disparition du réflexe oculo-palpebral, s'installe après l'injection de 0,5 mg/kg.; le retour à la normale s'effectue en 15 minutes (FIG. 1). La mort survient rapidement par asphyxie à la suite d'une dose de 0,75 mg/kg.

Lorsque le produit est injecté par voie intramusculaire, l'intoxication évolue plus lentement; la durée de la curarisation atteint 30 minutes après 2 à 4 mg.

Le produit est lentement résorbé par voie rectale; très faiblement par voie buccale.

Des signes discrets d'excitation médullaire précédant la curarisation ont été observés sur la souris et le rat alors qu'ils manquent totalement chez le lapin et le chien.

*Di-iodoéthylate de bis(quinoléxyloxy-8')-1,5 pentane (3381 R.P.)
Survie des animaux soumis à la respiration artificielle*

Dose en mg/kg	Nombre de doses mortelles	Lapin		Chien	
		Durée de la disparition du réflexe oculo- palpebral	Durée jusqu'au retablisement total	Durée de la disparition du réflexe oculo- palpebral	Durée jusqu'au retablisement total
0,75	1	0	0	0	0
1	1,3	5 m.	6 m.	5 m.	6 m.
1,5	2	—	1	12 m.	12 m.
2	2,5	30 m.	35 m.	—	—
3	4	43 m.	58 m.	20 m.	35 m.
4	5,3	45 m.	50 m.	1 h.	1 h. 15
7,5	10	1 h. 50	2 h.	2 h.	—
15	20	2 h. 20	2 h. 30	—	—
22,5	30	3 h.	3 h. 10	—	—
30	40	4 h. 50	5 h.	—	—
37,5	50	5 h.	5 h. 20	—	—
45	60 — 100	7 à 8 h.	7 à 8 h.	—	—
93,75	125	mort en 3 h.	—	—	—

Toxicité du di-iodoéthylate de bis(quinoléyloxy-8')-1,5 pentane (3381 R.P.)

		Dose curarisante mg/kg.	Dose 50 % lethale mg/kg.
Grenouille	—	10	env. 250
Souris	voie i.v.	—	1,25
	voie ssc.	—	30
	voie buccale	—	325
Rat	voie i.v.	—	1,25
	voie ssc.	—	30
Lapin	voie i.v.	0,175	0,75
	voie i.m.	1	5
	voie ssc.	—	10
	voie rectale	15	30
	voie buccale	—	500
Chien	voie i.v.	0,5	0,75

Survie des animaux en respiration artificielle

Le lapin lorsqu'il est soumis à une respiration mécaniquement entretenue tolère 100 fois la dose de 3381 R.P. qui se montre toxique pour un animal normal. Il survit dans ces conditions à une curarisation de plus de 8 heures. (TABLEAU p. 107).

L'essai réalisé chez le chien révèle une tolérance à plus de 10 doses toxiques.

On constate que la dose qui se montre toxique chez l'animal normal ne provoque pas chez l'animal en respiration artificielle, des signes visibles de curarisation, ce qui avait déjà été observé par TILLIÉ avec la curarine.

Effets tensionnels

Le fait qu'il est possible d'injecter impunément au lapin soumis à la respiration artificielle une quantité du produit (3381 R.P.) cent fois supérieure à la dose normalement toxique laisse déjà apparaître que les réactions vasomotrices consécutives aux doses moyennes du produit n'ont pas dans le tableau de l'intoxication une signification importante.

Effectivement, chez le lapin soumis à la respiration artificielle l'injection intraveineuse de 2,5 mg/kg. ne provoque encore aucune réaction tensionnelle. L'administration de 4 à 15 mg/kg. n'est suivie que d'hypotensions transitoires, dont la durée ne dépasse guère 5 à 10 minutes dans la majorité des expériences, et dont l'importance varie entre 20 à 60 mm. de mercure.

Chez le chien chloralosé on peut déjà noter dans les mêmes conditions une faible hypotension à des doses de 0,25 et 0,5 mg/kg. inférieures à

la dose curarisante. L'injection des doses plus importantes, susceptibles d'interrompre la respiration spontanée, 1 mg. et 4 mg., provoque une chute tensionnelle de 40 à 100 mm., dont l'animal se remet généralement en quelques minutes seulement, et toujours bien avant la fin de la paralysie curarique.

Le di-iodométhylate de bis-quinoléxyloxy-pentane provoque certaines réactions neuro-végétatives analogues à celles que l'on reconnaît classiquement aux constituants du curare, en particulier une paralysie du type nicotinique.

Chez le lapin l'intégrité des réflexes sensoriels apparaît nettement dans les expériences où l'on suit les variations de la pression; un attouchement ou un simple bruit provoque dans ce cas des oscillations tensionnelles importantes, plus importantes même chez l'animal qui a reçu une dose moyenne de 3381 R.P. que chez l'animal normal; elles cessent de se produire après l'injection de fortes doses du produit ou après anesthésie.

Effets cholinergiques et action anticholinestérasique

Le di-iodoéthylate de bis-quinoléxyloxy-pentane provoque sur les organes innervés par le parasymphatique un certain nombre de réactions cholinergiques :

1) L'accroissement du flux salivaire et de la sécrétion lacrymale au cours de la curarisation chez le lapin et le chien.

2) Un effet myotique qui s'observe chez le chat par l'installation d'une solution à 1 % à la surface du globe oculaire.

3) Sur la préparation de l'intestin isolé du lapin, une augmentation de l'amplitude des contractions, et, à plus forte concentration un accroissement du tonus (5 à 15 mg.).

L'action propre du 3381 R.P. sur les sécrétions et les muscles lisses est dans tous les cas inhibée par l'atropine.

L'analogie de ces réactions avec celles que provoque l'ésérine est mise en évidence par le fait que le 3381 R.P. potentialise les effets de l'acétylcholine; on l'a observé d'une part en ce qui concerne les effets hypotenseurs et cardio-inhibiteurs de l'acétylcholine sur la pression, d'autre part sur la préparation de l'oreillette du lapin (FIG. 2), sur laquelle les effets cardio-modérateurs de l'acétylcholine sont eux aussi accrus par l'addition préalable de 3381 R.P.

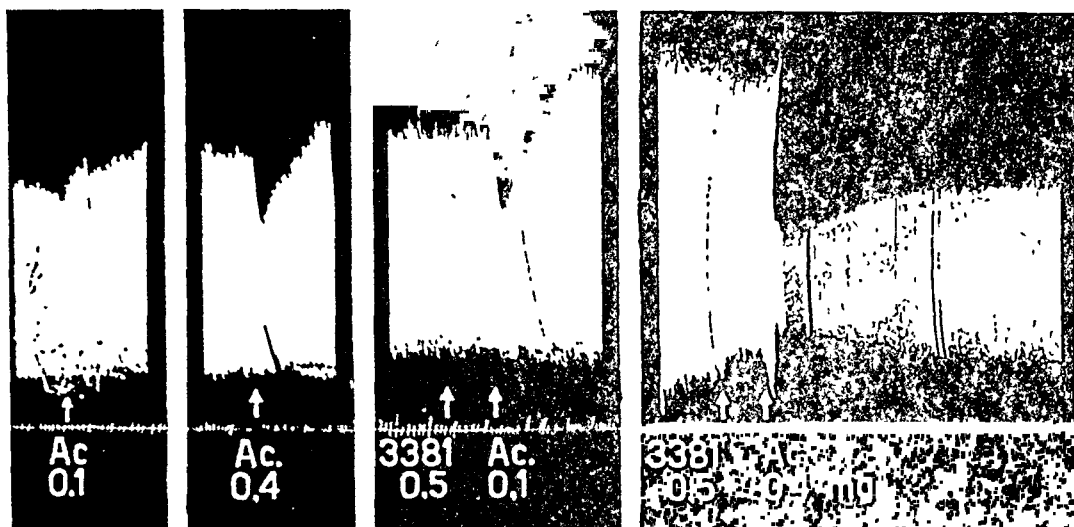


FIG. 2

Effet anticholinestérasique du 3381 R.P.

Potentialisation des effets de l'acétylcholine sur la préparation de l'oreille isolée de lapin

Acétylcholine (AC) — 0,1 et 0,4 mg/l.

3381 R.P. — 0,5 mg/l.

L'action anticholinestérasique que manifeste in vitro le 3381 R.P. vis-à-vis de la pseudo-cholinestérase sérique rend suffisamment compte des ces différents phénomènes. En suivant avec la technique de Ammon-Warburg l'hydrolyse enzymatique par le sérum de cheval, de l'acétylcholine, on met aisément en évidence une inhibition fermentaire qui se manifeste à des concentrations de 3381 R.P. de 1/1000 à 1/100.000⁽¹⁾.

Hydrolyse du chlorure d'acétylcholine par la pseudo-cholinestérase sérique en présence du 3381 R.P., de 3565 R.P. et de la tubocurarine

Technique de Ammon-Warburg.

Solution dans un liquide de Ringer-bicarbonate de Na. (R. 20).

Acétylcholine 0,4 % : 1,5 cc.

Sérum de cheval 50 % : 0,5 cc.

		mm ³ CO ² en 45 min.	Inhibition %
Témoin	—	213	—
3381 R.P.	0,01 g/l	136	36 %
	0,1 g/l	68	68 %
	1 g/l	30	86 %
3565 R.P.	1 g/l	210	nulle
Tubocurarine	0,1 g/l	172	20 %
	1 g/l	97	55 %

⁽¹⁾ Diverses publications ont, depuis la parution de la note préliminaire que nous avons publiée sur le produit 3381 RP (8), repris et étendu nos propres observations.

Dans deux notes, B. N. HALPERN, P. BENDA et G. BOURDON (*C. R. Soc. Biol.*, 1947, 141, 979 et 981) ont décrit d'autres aspects de l'action ésérinique du produit, indiquant que le 3381 R.P. renforce l'action de l'acétylcholine sur toutes les fonctions. L'explication de l'apparent paradoxe a été apportée par la suite par M. PETERFALVI et R. JÉQUIER (*C. R. Soc. Biol.*, 1948, 142, 729) qui ont pu vérifier que le parallélisme entre les effets qu'exerce le 3381 R.P. et l'ésérine ne se manifeste qu'au niveau des seuls muscles lisses, le produit apparaissant au contraire comme un antagoniste parfait de l'acétylcholine sur les muscles striés et sur le cœur isolé de grenouille.

*Paralysie neuro-musculaire par le 3381 R.P. chez le chien;
Effet décurarisant de l'ésérine*

Les analogies que présentent les propriétés du di-iodoéthylate de bis-(quinoléxyloxy-8')-1,5 pentane avec les constituants actifs du curare ont été rapportées en détail dans le paragraphe consacré au tableau de l'intoxication expérimentale. Il a été indiqué que l'on trouvait à certains stades de l'intoxication observés chez la grenouille, la disparition de l'excitabilité musculaire indirecte avec conservation de l'excitabilité directe.

Aux expériences diverses qui démontrent la diminution du tonus du muscle strié consécutive à l'administration du produit, on peut ajouter encore deux observations. Chez l'oiseau, dont les fibres musculaires de l'iris sont constituées par des muscles lisses, on observe, au contraire, de ce qui se passe chez les mammifères, une mydriase analogue à la mydriase curarique (FIG. 3).



FIG. 3
Effet mydriatique du 3381 R.P. chez la poule

Le 3381 R.P. qui exerce sur la musculature irienne lisse des mammifères un effet qui se traduit par un myosis, provoque par contre chez l'oiseau une mydriase caractéristique dont l'iris est constitué par des fibres striées. On sait que c'est là également une propriété caractéristique du curare.

Œil gauche : témoin.

Œil droit : instillation de 2 gouttes d'une solution à 1 % de 3381 R.P.

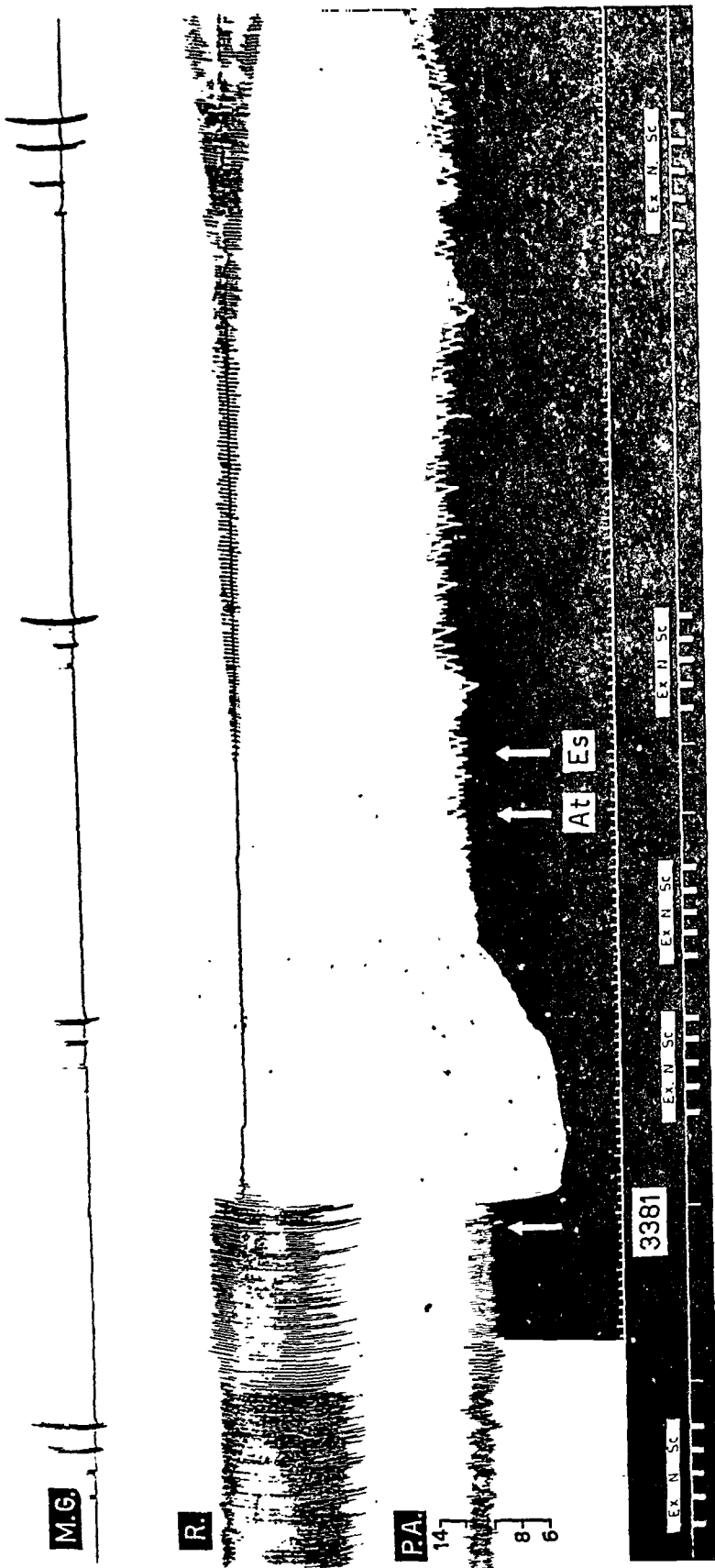


FIG. 4

Effet du 3381 R.P. sur la transmission neuro-musculaire, les mouvements respiratoires et la pression artérielle du chien chloralosé
Action antagoniste de l'éserine

1^{re} ligne : Contraction du muscle gastrocnémien (M.G.) consécutive à l'excitation électrique du nerf sciatique (Ex. N. Sc.) par des courants d'intensité croissante.
 2^{me} ligne : Enregistrement des mouvements respiratoires.
 3^{me} ligne : Pression artérielle.
 4^{me} ligne : Temps (en 10 secondes).
 L'expérience montre l'effet curarisant du produit 3381 R.P. à la dose de 5 mg/kg. i.v. A la suite de l'injection, l'arrêt respiratoire précède l'interruption de la conduction synaptique enregistrée sur les muscles striés de la patte; la réponse du muscle gastrocnémien fortement diminuée finit cependant par disparaître entièrement.

La suite de l'essai met en évidence l'effet antagoniste de l'éserine qui provoque une reprise progressive des mouvements respiratoires et de la conduction synaptique. L'animal a reçu immédiatement avant l'éserine (1 mg/kg.) une dose de 1 mg/kg. d'atropine destinée à prévenir les réactions cardiovasculaires de l'alcaloïde.

Il nous paraît qu'en tout état de cause, c'est par l'excitation in situ des nerfs moteurs du chien que l'on suivra le mieux l'action élective du produit sur la synapse neuro-musculaire.

Sur le chien chloralosé, l'injection d'une dose de 5 mg/kg. de 3381 R.P. par voie intraveineuse entraîne en une minute déjà une diminution de l'amplitude des contractions du muscle gastrocnémien et une augmentation du seuil d'excitabilité du nerf; trois minutes plus tard une série d'excitations indirectes n'apporte plus aucune réponse (FIG. 4). La paralysie évolue à peu près parallèlement sur les muscles volontaires et sur les mouvements spontanés du diaphragme; les excitabilités du nerf phrénique et du sciatique disparaissent simultanément.

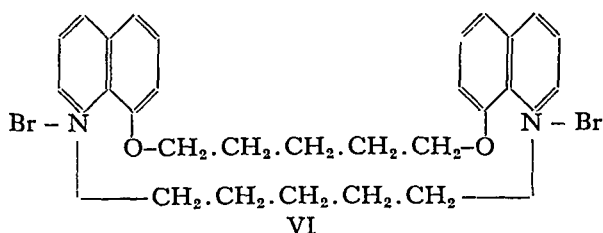
La curarisation se prolonge dans ces conditions normalement environ 5 heures; mais il est également possible sur la même préparation de mettre en évidence le rapide retour à la normale provoqué par une injection d'ésérine.

Dans ce but, on aura généralement soin d'atropiniser légèrement le chien pour prévenir les effets cardio-vasculaires et broncho-constricteurs de l'ésérine. Après 1 mg. d'atropine, on injectera 1 mg. également d'ésérine; le retour des mouvements respiratoires spontanés et de l'excitabilité musculaire s'établit progressivement dans les minutes qui suivent ⁽¹⁾

Activité des dérivés bis-quinoléiniques

A côté du iodoéthylate de bis(quinoléxyloxy)-pentane, quelques dérivés ont été préparés dont la structure se rattache plus étroitement à celle de la *d*-tubocurarine.

On citera par exemple le produit suivant (VI) ou d'autres dérivés dont la molécule renferme deux noyaux isoquinoléiniques.



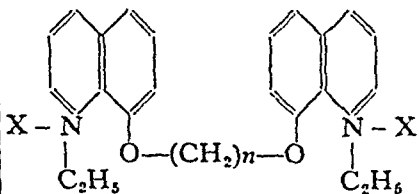
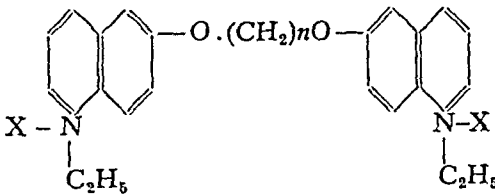
Dose curarisante	0,75 mg/kg
Dose toxique	0,75 mg/kg
Durée de la curarisation (10 D. T.)	8 h.
Tolérance du lapin à la respiration artificielle: . .	40 doses

⁽¹⁾ A. VAN DEN OSTENDE (*Arch. Intern. Pharmacod. et Thér.*, 1948, 75, 419) a décrit chez le chien traité par des doses de 3381 RP de 1 à 5 mg. une curarisation prolongée et l'arrêt de la conduction neuro-musculaire; il a reconnu la dépression de la pression artérielle et de l'homéostasie déjà signalée; l'auteur à juste titre insiste sur le fait que la prostigmine et le di-isopropylfluorophosphate ne lèvent l'action curarisante que de faibles doses de 3381 R.P.

L'étude d'une série de composés bis-oxy-quinoléiniques, si elle n'a pas révélé de substances particulièrement remarquables, nous a permis de tirer cependant un certain nombre de conclusions sur les rapports qui existent entre l'activité et la structure chimique.

L'activité passe par un optimum, dans la série des iodoéthylate de bis-(quinolélyloxy-8')-alcanes lorsque la chaîne qui unit les deux noyaux quinoléiniques comporte 5 atomes de carbone, pour les éthers des oxy-10-quinoléine, l'optimum correspond au cas d'une chaîne linéaire constituée par 3 atomes de carbone.

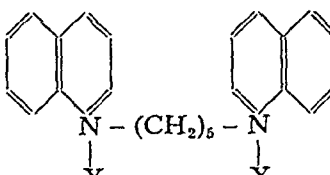
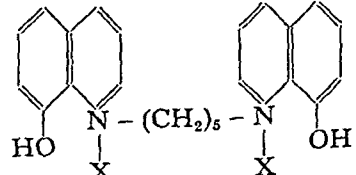
Comparaison entre les activités des éthers de l'oxy-6-quinoléine et de l'oxy-8-quinoléine
Rôle de la longueur de la chaîne aliphatique

						
	Dose curarisante	Dose toxique	Durée de la curarisation (10 doses)	Dose curarisante	Dose toxique	Durée de la curarisation (10 doses)
$n=3$	0,4 mg/kg.	1,5 mg/kg.	30 min.	0,65 mg/kg.	0,85 mg/kg.	1 h. 30
$n=4$	0,25	0,75	30 min.	0,75	2,0	2 h. 15
$n=5$	0,2 ⁽¹⁾	0,75	1 h.	1,25	7-8	toxique
$n=6$	0,2	0,3	1 h. 15	1,2	4	8 h.
$n=7$	0,4	0,75	40 min.	20	20	—

(¹) (3381 R.P.).

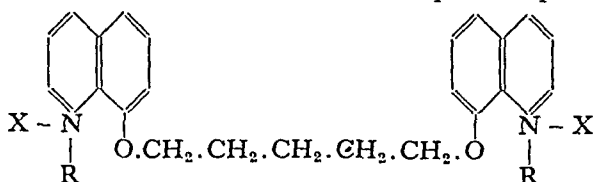
Certains dérivés dont la molécule comporte deux noyaux quinoléiniques sont fortement curarisants mais ils manifestent en même temps des effets hypotenseurs relativement prolongés.

Au 3381 R.P. on comparera le di-bromure de bis-(N-N' quinoléinium)-1,5-pentane (VII) et le dérivé oxydrylé correspondant (VIII) moins actif.

				
	VII.		VIII.	
Dose curarisante	1 mg/kg.		4 mg/kg.	
Dose toxique	3 mg.		6 mg.	
Durée de la curarisation	8 h.		1 h.	
Tolérance du lapin soumis à la respiration artificielle	—		50 doses	

Le radical fixé sur l'azote joue également un rôle.

Propriétés curarisantes des dérivés bisquinoléiniques



	Dose curarisante Lapin i.v. mg/kg.	Dose toxique Lapin i.v. mg/kg.	Respiration artificielle	
			Doses maxima tolérées	Durée (10 doses)
R = CH ₃	0,5	2	10	1 h. 40
R = C ₂ H ₅ ⁽¹⁾	0,2	0,75	100	1 h.
R = C ₃ H ₇	0,25	0,4	30	2 h. 45
R = C ₄ H ₉	0,65	2,5	15	1 h. 40
⁽¹⁾ (3381 R.P.).				

II. — BIS-(AMINOPHÉNOXY)-ALKANES

En poursuivant les recherches sur les rapports qui unissaient l'activité et la structure chimique des curares de synthèse, nous avons reconnu les propriétés des composés dont la molécule ne comportait pas les noyaux isoquinoléiniques et quinoléiniques caractéristiques de la *d*-tubocurarine et du *d*-iodoéthylate de bis(quinoléyloxy)-pentane.

Di-iodométhylate de bis-(diméthylamino-2' phénoxy)-1,5 pentane 3565 R.P.
(formule IV, p. 103)

On prépare le 3565 RP. en condensant le dibromopentane sur l'orthodiméthylaminophénol en présence de soude, dans l'alcool. Le bis-(diméthylamino-2' phénoxy)-1,5 pentane est transformé en ammonium quaternaire par action de l'iodure de méthyle dans l'acétone. Le produit brut est recristallisé dans l'alcool.

Le di-iodométhylate de bis-(diméthylamino-2' phénoxy)-1,5 pentane (3565 R.P.) cristallise en petits cristaux incolores fondant au bloc Maquenne à 210° (fusion instantanée). Il est soluble dans l'eau à 3 % à 20° et très soluble à 100°.

Le di-iodométhylate de bis-(diméthylamino-2' phénoxy)-1,5 pentane (3565 R.P.) est intéressant au point de vue pharmacologique parce que dépourvu de toute activité éserinique.

Sur la grenouille, le 3565 R.P. provoque une paralysie neuro-musculaire à la dose de 2,5 mg/kg. La curarisation s'établit après 20 à 40 minutes et l'animal est entièrement remis au bout de 24 heures. A la suite de l'injection de doses plus élevées, l'animal reste paralysé pendant plusieurs jours alors que le cœur continue à battre normalement.

La dose toxique est difficile à fixer avec précision dans ces conditions mais on peut considérer qu'il faut injecter pour tuer l'animal une quantité de produit (375 mg/kg.) 150 fois supérieure à la dose curarisante.

L'antagonisme vis-à-vis de l'acétylcholine se manifeste bien sur la préparation du muscle droit abdominal de la grenouille. L'addition de 3565 R.P. à la concentration de 5 mg/kg. s'oppose à la contracture provoquée par 1 mg/kg. d'acétylcholine (FIG. 5).

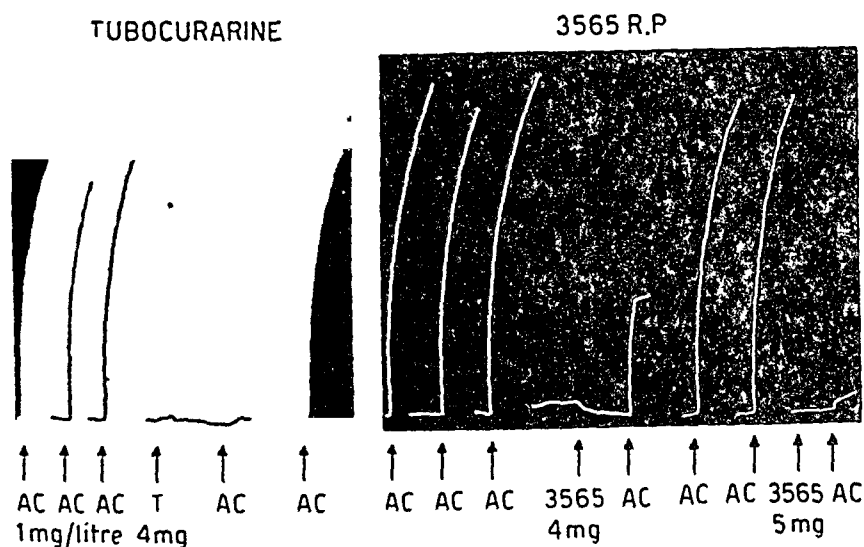


FIG. 5

Antagonisme du 3565 R.P. et de l'acétylcholine — Comparaison avec la tubocurarine

Sur la préparation du muscle droit abdominal de la grenouille, l'addition d'acétylcholine provoque une contracture à laquelle s'opposent efficacement les curares naturels et de synthèse. On a figuré ici l'antagonisme exercé par la tubocurarine (4 mg/l.) et le 3565 R.P. (4 et 5 mg/l.).

Chez le lapin, la dose qui provoque un relâchement de la musculature de la nuque (head-drop-dose) est du même ordre pour le 3565 RP. et la tubocurarine, mais l'écart entre cette dose et la dose toxique est plus marquée pour le premier produit.

Toxicité du di-iodométhylate de bis(diméthylamino-2'-phénoxy)-1,5-pentane (3565 R.P.)

		Dose curarisante mg/kg.	Dose toxique mg/kg.
Grenouille		2,5	375
Souris	voie i.v.	—	0,75
	voie s.c.	—	1,5
	voie buccale	—	125
Rat	voie i.v.	—	0,8
	voie s.c.	—	1,25
Lapin	voie i.v.	0,2	0,3
	voie s.c.	—	0,4
Chien	voie i.v.	—	0,2

Lorsqu'on administre au lapin soumis à la respiration artificielle des quantités plus élevées du produit, on constate qu'il s'établit une curarisation dont la durée est particulièrement prolongée.

Enfin l'électivité de l'action qui s'exerce sur la synapse neuro-musculaire des fibres striées apparaît clairement par le fait que l'on peut administrer sans dommage pour l'animal soumis à la respiration artificielle; 500 fois la dose qui se montre toxique pour l'animal normal.

L'enregistrement du tracé de la pression carotidienne montre que le produit n'abaisse la pression que d'une manière transitoire à la dose de 2 mg/kg.

Le di-iodométhylate de bis-(diméthylamino-phénoxy)-pentane est plus actif et moins toxique que la tubocurarine pour le chien dont il provoque la mort par asphyxie à la dose de 0,2 et parfois même de 0,1 mg/kg.

La paralysie respiratoire progresse très régulièrement sans que le rythme respiratoire soit affecté. L'excitabilité du nerf sciatique diminue puis disparaît peu après qu'ont cessé les mouvements spontanés de la respiration. L'ésérine à la dose de 1 mg/kg. parvient à rétablir la conduction neuro-musculaire interrompue.

Les doses inférieures à la dose qui provoque une paralysie respiratoire ne sont suivies que d'une dénivellation insignifiante de la pression.

A la dose curarisante on observe généralement une brusque chute de la tension. Cet effet est plus marqué avec le di-iodométhylate de bis-(diméthylamino-phénoxy)-pentane qu'avec le iodométhylate de quino-léyloxy-pentane; il est analogue à celui que peut provoquer l'injection de *d*-tubocurarine.

Il a été observé que le 3565 R.P. n'exerçait in vitro aucune activité anticholinestérasique. En fait il ne provoque chez l'animal également aucun des signes d'hypertonie parasympathique, salivation, potentialisation des effets de l'acétylcholine et contracture de l'intestin isolé du lapin qui ont été décrits dans le chapitre consacré au dérivé quino-léinique 3381 R.P.

Activité des bis-(aminophénoxy)-alkanes

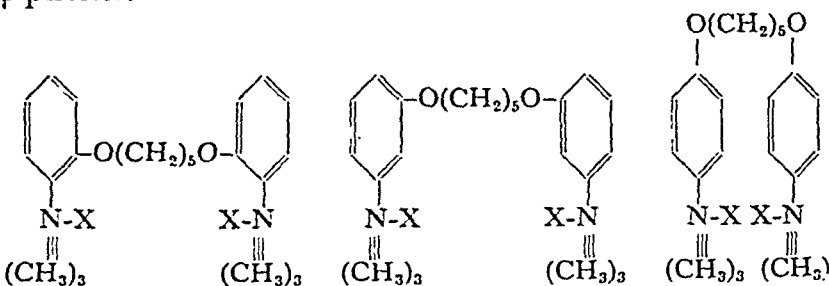
Le di-iodométhylate de bis-(diméthylamino-2'-phénoxy)-1,5 pentane ne représente qu'un des termes de la série des bis-(aminophénoxy)-alkanes.

Nous avons reconnu une activité pharmacologique analogue à de nombreux autres dérivés du même groupe.

Dans la série des dérivés de l'amino-2-phénol, on a fait varier parallèlement la nature des substituants sur l'azote et la distance des deux noyaux benzéniques.

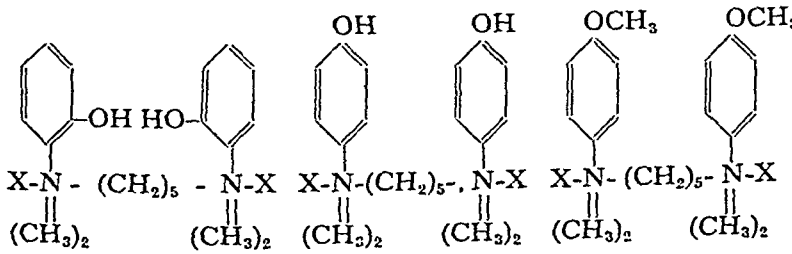
Il n'existe pas de différence systématique importante entre les effets des dérivés éthers des di-alcools en C_4 , C_5 et C_6 . Toutefois plusieurs termes de la série se sont montrés susceptibles de provoquer chez le chien une hypotension importante et durable.

L'exemple suivant illustre l'activité des dérivés de l'amino-3-phénol et de l'amino-4-phénol.

			
<i>Lapin voie i.v.</i>	IX	X	XI
Dose toxique	0,25 mg/kg.	0,45	0,85
Durée de la curarisation (après 10 D.T.)	4 h.	7 h.	6 h.

Tous les produits étudiés se sont révélés des curarisants très actifs dont l'action élective se traduit par le fait que le lapin soumis à une respiration artificielle tolère plus de 100 fois les doses normalement toxiques.

Comme on l'avait fait dans la série quinoléinique, on a comparé aux éthers les composés quaternaires dans lesquels la chaîne aliphatique relie directement des fonctions attachées aux deux noyaux.

			
<i>Lapin voie i.v.</i>	XII	XIII	XIV
Dose curarisante	3 mg/kg.	2	2
Dose toxique	7,5	2,5	3
Durée de la curarisation (après 10 D.T.)	2 h.	2 h. 30	2 h. 15

Ces composés sont moins actifs que les précédents, mais demeurent des poisons curarisants typiques, dont le lapin sous respiration artificielle tolère une dose 100 fois supérieure à la dose paralysante.

DISCUSSION

L'étude qui précède apporte de nouveaux éléments à la connaissance des produits curarisants de synthèse.

Du point de vue pharmacologique, elle établit l'intérêt qu'il y a à avoir recours à l'expérimentation sur les mammifères pour définir un groupe de poisons curarisants dont l'effet se rapproche de celui des alcaloïdes des curares non seulement par leur activité sur la transmission neuro-musculaire mais encore par l'électivité de cet effet et par l'absence de réactions secondaires, cardiovasculaires ou centrales importantes.

A cet égard la détermination de la dose qui provoque la mort de l'animal dont la respiration est mécaniquement entretenue et le rapport entre cette dose et la quantité de produit toxique pour l'animal normal sont appelés à fournir des renseignements valables. Nous avons constaté que dans ces conditions le lapin survit à l'injection de plus de 500 toxiques de *d*-tubocurarine et de certains produits de synthèse. Un coefficient supérieur à 100 se rencontre dans la majorité des dérivés que nous avons préparés.

On trouvera d'autre part dans l'analyse des propriétés du iodoéthylate de bis-quinoléxyloxy pentane, du iodométhylate de bis-quinoléxyloxy pentane et du iodométhylate de bis-diméthylaminophényloxy-pentane, plusieurs éléments qui permettent d'entrevoir qu'il existe certains rapports entre l'effet des curares et celui des substances que l'on peut appeler cholinergiques ou cholinotropiques (MARAZZI), dont l'action mimétique ou paralysante s'exerce sur les mêmes récepteurs cellulaires que l'acétylcholine. Chez la grenouille on a pu observer que l'effet curarisant évolue parallèlement à un antagonisme vis-à-vis de la contraction que l'acétylcholine exerce sur le muscle strié (*rectus abdominis*). Sur les mammifères on a observé que les dérivés curarisants témoignent également des propriétés paralysantes nicotiques au niveau des ganglions du système nerveux végétatif. On a observé enfin que l'effet décurarisant de l'ésérine s'exerce de la même façon sur les intoxications par les curares naturels et les curares de synthèse.

Quant à l'effet anticholinestérasique qui a été occasionnellement décrit pour la tubocurarine mais que d'autres produits naturels curarisants, tels que l'érythroïdine ne manifestent pas, il paraît être un phénomène secondaire qui varie tout-à-fait indépendamment de l'activité curarisante propre de la molécule; en fait nous avons constaté qu'il est manifeste dans la molécule des dérivés quinoléiniques (3381 R.P.) mais que les

dérivés de l'aminophénol (3565 R.P.) n'inhibent par contre aucunement l'action de la pseudo cholinestérase sérique.

Du point de vue chimique, les composés dont l'activité a été décrite dans ce travail, appartiennent à des séries nouvelles.

Les molécules actives comportent toutes deux fonctions ammonium quaternaires et à cet égard elles peuvent être comparées à la *d*-tubocurarine.

Par contre ni la présence d'un noyau hétérocyclique, ni la présence d'une liaison du type éther, ne paraissent nécessaires à l'activité curarisante de la molécule.

Il apparaît dès lors que le groupe des curarisants de synthèse promet d'être fort étendu et que leur étude se prêtera aisément dans l'avenir à de nombreux développements.

CONCLUSIONS

1) Par simplifications successives de la molécule de la *d*-tubocurarine, on parvient aisément à la synthèse de dérivés susceptibles de manifester des propriétés curarisantes analogues à celles que présente l'alcaloïde naturel.

L'étude des propriétés curarisantes a porté plus spécialement sur les mammifères. Chez le lapin en particulier on a déterminé systématiquement la dose curarisante minima (dose head-drop), la dose toxique, ainsi que les réactions de l'animal soumis à la respiration artificielle (durée de la curarisation consécutive à l'injection de 10 doses toxiques et nombre de doses toxiques dont l'injection est compatible avec la survie).

On a rapporté dans ce travail les résultats physiologiques concernant des dérivés chimiquement nouveaux, appartenant à la série des bis-quinoléyloxy-alkanes et des bis-aminophénoxy-alkanes.

2) Dans une première partie on a décrit les propriétés curarisantes du di-iodoéthylate de bis-(quinoléyloxy-8')-1,5-pentane (3381 R.P.) et de 16 dérivés dont les molécules comprennent deux noyaux quinoléiniques à fonction ammonium quaternaire.

Le 3381 R.P. représente le premier dérivé de synthèse dont l'activité curarisante se soit manifestée sur les mammifères avec une électivité comparable à celle des alcaloïdes naturels du curare.

Chez le lapin la dose minima curarisante est de 0,2 mg/kg et la dose toxique de 0,75 mg/kg.; la dose maxima tolérée représente 70 fois la dose toxique pour l'animal dont la ventilation pulmonaire est assurée mécaniquement.

Le 3381 R.P. est hypotenseur pour le chien ; il provoque une paralysie du type nicotinique et une potentialisation des effets de l'acétylcholine liée aux propriétés anticholinestérasiques de la molécule.

3) La suite des recherches ayant montré que le noyau quinoléinique qui entrerait dans la molécule du 3381 R.P. n'était pas indispensable à l'activité de la molécule, les recherches orientées dans la voie des produits de condensation des aminophénols avec les dibromo-alkanes ont conduit au di-iodométhylate de bis-(diméthylamino-2'-phénoxy)-1,5-pentane (3565 R.P.) qui, plus actif et plus toxique que le précédent, se montre sur certaines préparations aussi et plus fortement curarisant que la *d*-tubocurarine elle-même. Contrairement aux dérivés de la série quinoléinique, les curares dérivés de l'aminophénol ne manifestent aucune propriété anticholinestérasique.

4) Les molécules actives comportent deux fonctions ammonium quaternaires et peuvent à cet égard être comparées à la *d*-tubocurarine. Par contre ni la présence d'un noyau hétérocyclique, ni celle d'une liaison du type éther ne paraissent nécessaires à l'activité curarisante de la molécule.

BIBLIOGRAPHIE

1. — CRUM BROWN, A. et FRASER, T. R. *Trans. Roy. Soc. Edinburgh*, 1869, 25, 151, 693.
2. — CHASE, H. F. et LEHMAN, A. J. *J. Pharmacol.*, 1942, 75, 265.
3. — SEVIN, A. G., in DELOURME-HOUDÉ, J. *C. R. Ac. Sc.*, 1945, 221, 60.
4. — WILLSTAETTER, R. et HEUBNER, W. *Ber. deutsch. Chem. Ges.*, 1907, 40, 3869.
5. — BERLIN, E. *Z. f. Biol.*, 1912, 57, 1.
6. — ACKERMANN, D. *Münchn. med. Wschr.*, 1921, 68, 12.
7. — ROHMANN, C. et ZIETAN, K. *Ber. deutsch. Chem. Ges.*, 1938, 71, 296.
8. — BOVET, D., COURVOISIER, S., DUCROT, R. et HORCLOIS, R. *C. R. Ac. Sc.*, 1946, 223, 597.
9. — BOVET, D., COURVOISIER, S., DUCROT, R. et HORCLOIS, R. *C. R. Ac. Sc.*, 1947, 224, 1733.
10. — BOVET, D., DEPIERRE, F. et DE LESTRANGE, Y. *C. R. Ac. Sc.*, 1947, 225, 74.
11. — HOLADAY, H., cit. in WINTERSTEINER, O. et DUTCHER, J. D. *Science*, 1943, 97, 467.
12. — TILLIE, J. *Arch. exp. Pathol. u. Pharmacol.*, 1897, 27, 1.
13. — LEGROUX, R., JERAMEC, C. et LEVADITI, J. C. *Ann. Institut Pasteur*, 1945, 71, 480.

LABORATORIO DI CHIMICA TERAPEUTICA
ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ — ROMA

L'ANTAGONISME CURARE-ACÉTYLCHOLINE ET LA NOTION DE pA_x

PAR

SALVATORE GUARINO ET DANIEL BOVET

(Travail reçu le 7-3-1949).

La nécessité d'établir un système de comparaison rationnel entre les diverses substances douées d'un antagonisme pharmacologique s'est progressivement imposé à mesure que le domaine des substances biologiquement actives dont les effets s'opposaient à ceux de l'adrénaline, de l'acétylcholine et de l'histamine prenait plus d'extension et que se développait la même notion de compétition également dans l'étude des activités antibactériennes. C'est ainsi que l'on a cherché à mesurer l'activité antagoniste d'un produit vis-à-vis d'un autre, par une expression suffisamment simple dont la valeur facile à établir se puisse aisément retrouver dans des conditions expérimentales assez diverses.

Il semble que la méthode proposée par SCHILD (1), et qui correspond également à un concept établi antérieurement par CLARK et RAVENTOS (2) réponde assez bien à ces conditions. Ayant en effet étudié quantitativement la réponse d'un muscle à l'addition d'une quantité constante de l'effecteur, ces auteurs ont pour la première fois proposé d'apprécier l'activité d'une substance antagoniste, *par la mesure de la concentration susceptible de neutraliser l'effet d'un accroissement correspondant à un multiple de la substance active*. Dans la mesure où cette détermination ne nécessite qu'une variation de concentration de l'effecteur, la seconde réponse en présence de l'antagoniste devant représenter un effet biologique identique à celui qui, le premier, a été réalisé en réponse à l'addition du seul effecteur, elle peut être considérée comme relativement indépendante des conditions expérimentales, et en particulier des variations dues aux différentes sensibilités des diverses préparations biologiques.

SCHILD a donné à ce concept une forme particulièrement heureuse, en désignant par l'expression pA_x le logarithme négatif de la concentration moléculaire de l'antagoniste susceptible d'accroître dans une proportion constante (x) la concentration d'un produit actif nécessaire pour provoquer un effet arbitrairement choisi. Cette notation permettra de caractériser par un simple chiffre l'activité antagoniste de diverses substances, comme aussi d'en établir l'échelle des valeurs et de fixer la spécificité des réactions d'un même antagoniste vis-à-vis de différents effecteurs.

SCHILD a donné dans son travail la valeur de pA_x correspondant à une série de couples de substances antagonistes, déterminant en particulier les valeurs pA_2 et pA_{10} pour étudier les variations de l'antagonisme en fonction des modifications de la concentration et pour comparer les chiffres obtenus lorsque variaient — de 2 minutes à 14 minutes — les temps de contact. REUSE (3), utilisant la même méthode, a pu comparer utilement l'activité antihistaminique des différents produits et justifier l'emploi des faibles concentrations de néoantergan chaque fois qu'il s'agit d'établir la nature histaminique de l'effet d'un extrait tissulaire.

L'utilisation de cette notation étant susceptible d'être généralisée à l'ensemble des antagonismes pharmacodynamiques, nous avons pour notre part jugé qu'il pouvait être utile d'étendre l'application du concept de pA_x à de nouveaux problèmes et à d'autres préparations biologiques.

A cet égard, une analyse quantitative de l'antagonisme entre le curare et l'acétylcholine, qui, quoique connu de longue date n'a pas reçu encore sa pleine explication, devait être particulièrement instructive. Nous l'avons abordé en mettant en œuvre les curares de synthèse récemment préparés, dont on pouvait prévoir que tant à cause des propriétés électives qu'ils manifestent qu'en raison des analogies chimiques que l'on peut reconnaître entre la structure de leur molécule et celle de l'acétylcholine elle-même, l'étude serait en mesure de fournir des faits particulièrement aptes à illustrer les différents aspects d'une théorie de l'antagonisme.

Il semble d'autre part que le choix du muscle droit abdominal de la grenouille ait constitué un test biologique favorable, en ce qu'il présente l'avantage de réagir à une gamme de doses d'acétylcholine et de curare particulièrement étendue.

Nos recherches ont en premier lieu montré que la notion de pA_x pouvait s'appliquer à un nouveau type d'antagonisme pharmacologique; elles ont conduit d'autre part à une extension de la conception originale, les faits nouveaux apportent en outre la démonstration de la nature compétitive de l'antagonisme envisagé.

TECHNIQUE

Les expériences ont été réalisées sur le muscle abdominal de la grenouille (*rana temporaria*), baignant dans un volume de 100 cc. d'une solution de liquide de Ringer oxygéné. Les contractions ont été enregistrées sur un chimographe au moyen d'un levier isotonique avec une amplification de 20/1. Tenant compte des considérations précédemment développées (4), les contractions ont été enregistrées quelle que fut leur rapidité jusqu'au moment où elles avaient effectivement atteint leur hauteur maxima; la valeur de chaque contraction correspond dans chaque essai à la distance qui sépare l'amplitude maxima de la ligne de repos du muscle.

Les produits utilisés ont été le bromure d'acétylcholine, et, comme curare, le triiodoéthylate de tri-(β -diéthylaminoéthoxy)-1,2,3-benzène, 2559 F. ou Flaxedil (5).

Détermination de la valeur pA_x dans l'antagonisme 2559 F-acétylcholine

Nos premières expériences ont visé à fixer dans l'antagonisme qui oppose le curare 2559 F. à l'acétylcholine, sur le muscle droit abdominal de la grenouille, les indices pA_2 et pA_{10} de SCHILD.

Dans ce but, après avoir examiné en un premier temps la réponse du muscle à l'addition d'une dose fixe — 0,4 mg/l. — d'acétylcholine, l'on ajoutait à la solution une quantité de curare telle que le contact avec une solution d'acétylcholine deux fois supérieure (pA_2 , acétylcholine 0,8 mg/l.) ou 10 fois plus concentrée (pA_{10} , acétylcholine 4 mg/l.), provoque une réponse analogue à la réaction initiale.

Le temps de contact entre le curare et le muscle a été fixé à 5 minutes, les résultats apparaissent sensiblement égaux pour des temps supérieurs.

Les résultats de chaque expérience étaient ensuite rapportés sur un diagramme, sur lequel on a fait figurer en ordonnées les variations percentuales par rapport à la contraction initiale, de la hauteur de la contraction du muscle curarisé, et en abscisse, le logarithme de la concentration de 2559 F. La valeur cherchée de pA_x était alors déterminée graphiquement; elle correspond au chiffre de la concentration correspondant à une variation nulle par rapport au témoin.

On utilise en pratique, un muscle pour la détermination de chacun des points singuliers, dans le but d'éviter la dépression qui peut suivre l'addition des doses relativement élevées de curare que l'on doit mettre en œuvre pour la détermination du pA_{10} .

A partir de 10 déterminations au moins portant sur autant de préparations différentes, les valeurs obtenues ont été dans ces conditions :

$$\text{pour } pA_2 = 5,67 \pm 0,05$$

$$\text{pour } pA_{10} = 4,34 \pm 0,11$$

S'il y avait eu entre l'accroissement des effets exercés par l'antagoniste et celui de la substance active un parallélisme strict, il aurait dû correspondre à une multiplication par 5 de la concentration en acétylcholine, une augmentation analogue de la teneur en 2559 F. et l'on aurait pu s'attendre à observer entre les deux valeurs pA_2 et pA_{10} une différence de 0,699 correspondant à $\log. 5$.

L'écart est en réalité très supérieur; les deux valeurs diffèrent de 1,33, ce qui indique qu'il est nécessaire, pour neutraliser une dose 5 fois supérieure, d'accroître la concentration de 2559 F. dans le rapport de 21 à 1.

La différence entre les valeurs expérimentales et calculées de pA_2 et pA_{10} a déjà été signalé par SCHILD qui, reprenant l'hypothèse formulée par GADDUM a indiqué qu'il pourrait être attribué au caractère compétitif de la fixation des deux antagonistes au niveau des mêmes récepteurs : « The difference between pA_2 and pA_{10} provides a quantitative test for the hypothesis that antagonists compete with drugs for reception according to a simple mass action relation ».

Les écarts extrêmes signalés par cet auteur concernent les systèmes dolantine/acétylcholine et néoantergan/histamine, pour lesquels aux valeurs de pA_2 et pA_{10} de l'effecteur correspondent des concentrations en antagoniste qui varient dans le rapport de 13 à 1.

Les écarts observés dans les expériences que nous avons nous mêmes poursuivies, nous ont paru dès lors mériter une attention particulière. Il est apparu d'une part qu'ils pourraient établir la nature compétitive s'exerçant sur le muscle au niveau des mêmes récepteurs, de l'antagonisme qui se manifeste entre un curare et l'acétylcholine, et d'autre part que l'interaction entre les deux substances qui se manifeste dans ce cas avec une particulière évidence devait permettre d'entrer plus avant dans l'analyse des phénomènes d'équilibre communs à tous les antagonismes.

C'est la raison pour laquelle nous l'avons examiné sous ses différents aspects, examinant :

1) L'action d'une même quantité de 2559 F. sur les contractures provoquées par différentes doses d'acétylcholine.

2) Les concentrations d'acétylcholine et de 2559 F. nécessaires pour provoquer une réponse biologique d'intensité constante.

3) Les valeurs de pA_2 correspondant aux différentes concentrations en acétylcholine.

Antagonisme, vis-à-vis des différentes doses d'acétylcholine, d'une même quantité de 2559 F.

Le concept de pA_x suppose par hypothèse que, quelque soit la concentration de la substance active mise en jeu, l'inhibition produite par l'adjonction d'une quantité donnée de la substance inhibitrice sera nécessairement constante.

Prenant l'exemple de l'antagonisme atropine-acétylcholine, on observera que si une concentration donnée d'atropine (1 mg/l.) diminue efficacement la contracture acétylcholinique, réduisant à celui de 0,02 mg/l. l'effet d'une dose de 0,04 mg., la même quantité d'alcaloïde

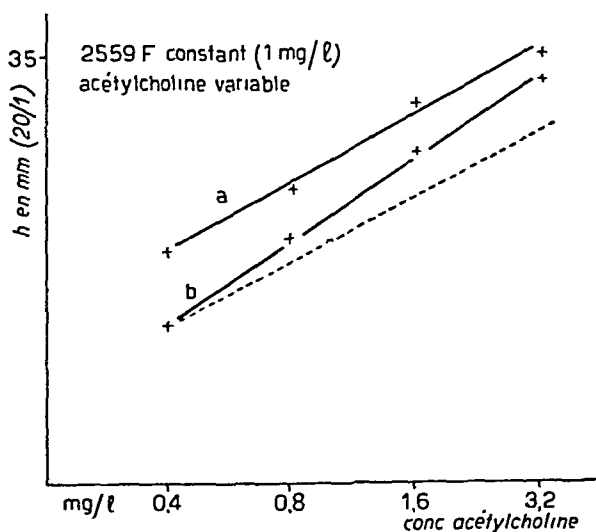


FIG. 1

La ligne a) joint les valeurs correspondant aux hauteurs des contractions consecutives à l'addition de doses d'acétylcholine croissantes.

La ligne b) représente l'effet des mêmes concentrations d'acétylcholine, agissant en présence d'une quantité constante de curare (2559 F., 1 mg/l.).

On a figuré en pointillé (---) une ligne parallèle à la ligne a), qui figurerait la hauteur des contractions dans le cas où la même dose de curare exercerait un effet constant sur les différentes concentrations d'acétylcholine.

devra également amener à l'action de 0,16 mg. l'effet de 0,08 mg/l. et ainsi de suite. Cette observation, déjà formulée par GADDUM, fut confirmée par SCHILD, mettant en œuvre divers groupes de substances antagonistes.

SCHILD put conclure de ses expériences qu'il n'existait du point de vue statistique, pas de divergence significative entre les courbes obtenues

en ajoutant différentes concentrations de la substance active en présence ou en l'absence d'une quantité fixe de l'antagoniste.

De nos propres essais nous avons été amenés à conclure que l'effet d'une quantité donnée de 2559 F. n'est pas le même sur les contractions provoquées par différentes concentrations d'acétylcholine, mais qu'il diminue progressivement lorsqu'augmentent les doses de l'effecteur (FIG. 1).

Cette observation doit être mise en rapport avec la nature des substances antagonistes que nous avons utilisées et avec la forme particulière de l'équilibre qui les oppose, comme avec le fait que, précisément dans cet antagonisme du 2559 F. et de l'acétylcholine, on a déjà noté un écart particulièrement marqué entre les valeurs pA_2 et pA_{10} .

Dans les essais rapportés à la figure 1 l'écart entre les valeurs obtenues et les valeurs calculées dans les différentes expériences, nul pour une concentration en acétylcholine de 0,4 mg/l. atteint 20 % pour une concentration de 0,8 mg/l., 40 % pour la concentration de 1,6 mg/l. et 60 % enfin pour la concentration de 3,2 mg/l.

Le fait que des différences systématiques analogues n'aient pas été rapportées dans les essais réalisés sur l'intestin isolé avec d'autres substances, tient peut-être aux variations statistiques que comporte l'expérience; il ne saurait être affirmé qu'elles n'existent pas puisque dans les cas rapportés également, l'écart entre les valeurs observées de pA_2 et pA_{10} laisserait supposer que l'effet de la substance antagoniste diminue lorsque s'accroît la concentration de la substance active.

Détermination des concentrations d'acétylcholine et de 2559 F. nécessaires pour obtenir une réponse biologique constante

La recherche des différentes concentrations, tant en acétylcholine qu'en curare, dont la combinaison conduit à une contraction de hauteur constante fournit du même phénomène une illustration qui complète celle des expériences précédentes.

Si l'effet produit par une concentration déterminée de l'antagoniste était effectivement indépendante de la concentration de la substance active, on devrait constater également dans cet essai où la réponse biologique recherchée est égale, qu'à chaque augmentation de la concentration de l'un des produits correspond un accroissement proportionnel de l'autre.

L'expérience permet avec une particulière évidence d'observer qu'il n'en est rien; la concentration du 2559 F. augmente beaucoup plus

rapidement que ne s'accroissent les concentrations correspondantes en acétylcholine.

La figure 2 traduit ces résultats, montrant que si à une dose d'acétylcholine de 0,8 mg/l. correspond une quantité de 1,9 mg. de 2559 F., à 1,6 mg. d'acétylcholine correspondront 9 mg. de 2559 F.; à 4 mg. d'acétylcholine 40 mg.; à 6,4 mg. d'acétylcholine 80 mg. de 2559 F.

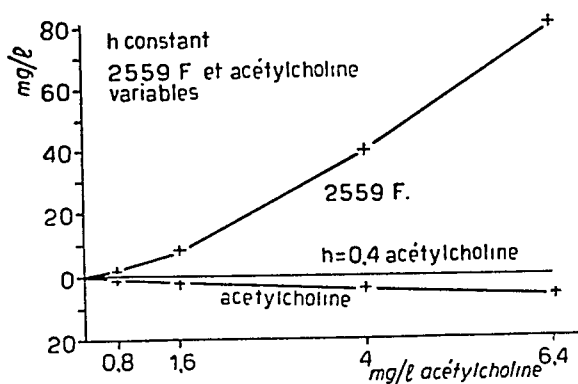


FIG. 2

La courbe dans ce cas ne fait qu'illustrer un autre aspect de l'écart signalé plus haut entre les valeurs théoriques et obtenues que l'on doit attribuer aux indices pA_2 et pA_{10} .

Variations selon la concentration initiale en acétylcholine des valeurs observées de l'indice pA_2

Si, dans l'expérience précédente l'on a été conduit à reconnaître que la valeur de l'effet du curarisant variait selon la concentration de l'acétylcholine mise en œuvre, il devient évident que cela impliquera également un facteur de variation nouveau dans la détermination de la valeur même de l'indice pA_2 .

Une série de déterminations montre que, dans les cas de l'antagonisme 2559 F./acétylcholine il en est bien ainsi.

Déterminant l'indice pA_2 dans des conditions suffisamment différentes, on a effectivement constaté que les concentrations en acétylcholine utilisées sont susceptibles de faire varier les résultats obtenus, la valeur de pA_2 observée diminuant progressivement lorsque croît la dose de l'acétylcholine mise en œuvre dans les essais.

Bromure d'acétylcholine			2559 F. — Quantité nécessaire pour rendre l'effet de l'acétylcholine équivalent à $\alpha/2$		
mg/l	conc. mol. (x)	-log. conc.	mg/l	concentration moléculaire	pA_2 (-log. conc.)
0,8	3,5 . 10^{-6}	5,45	1,9	2,1 . 10^{-6}	5,67
4	1,77 . 10^{-6}	4,75	4	4,4 . 10^{-6}	5,35
20	8,8 . 10^{-6}	4,05	6,5	7,2 . 10^{-6}	5,14

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Les phénomènes d'antagonisme pharmacologiques dans lesquels à l'effet d'une substance effectrice s'oppose efficacement l'action d'une substance inhibitrice qui s'exerce au niveau d'un même récepteur, revêt au point de vue quantitatif des aspects différents suivant l'importance que prennent les phénomènes d'équilibre qui peuvent survenir au cours de la réaction.

Le cas le plus simple constitue ce que l'on peut appeler *l'antagonisme par combinaison stable*; dans ce cas l'équilibre avec le récepteur des deux substances antagonistes est complètement déplacé en faveur de la combinaison substance paralysante-récepteur.

C'est à ces conditions dans lesquelles la dépression produite par une concentration donnée de l'antagoniste est indépendante de la concentration utilisée de l'effecteur, que la conception de pA_x répond de la façon la plus adéquate. L'analyse qu'en a donné SCHILD montre que l'antagonisme qui s'observe au niveau de l'intestin de cobaye entre l'atropine et l'acétylcholine répond assez exactement à ce mécanisme, qui par ailleurs paraît assez répandu.

Par analogie avec ce qui s'observe tant en chimie qu'en enzymologie, on peut supposer qu'il existe un second type d'antagonisme, *l'antagonisme compétitif* dans lequel interviendront entre les deux substances antagonistes des réactions d'équilibre.

L'antagonisme compétitif correspond au cas où, additionnant les deux substances antagonistes en vue d'obtenir une série de réponses d'intensité égales, on constate que le rapport entre les concentrations de l'une et de l'autre des produits, loin d'être constant, s'accroît régulièrement à mesure qu'augmente la quantité de l'effecteur mis en jeu.

Nous avons montré dans une précédente publication (6) qu'on pouvait

donner de ce fait une interprétation théorique, si l'on considérait par hypothèse le curare (2559 F.) comme constitué par les molécules d'une « fausse acétylcholine » susceptibles de réagir avec les récepteurs selon un équilibre identique à celui de l'acétylcholine sans provoquer la contracture du muscle.

On pourra alors conduire l'expérience dans les conditions suivantes. Imaginons tout d'abord que l'on ajoute à la solution saline de Ringer qui baigne un muscle droit de grenouille une quantité (x) d'acétylcholine telle qu'elle provoque une contraction (h) constante, ayant renouvelé le liquide physiologique, il correspondra à l'addition d'une quantité double ($2x$) d'acétylcholine une seconde réponse d'une amplitude notablement supérieure. Que se passera-t-il si, à la solution concentrée d'acétylcholine de concentration ($2x$), nous substituons une nouvelle solution dans laquelle à la même quantité ($2x$) d'acétylcholine, l'on aura ajouté un nombre égal de molécules de la « fausse acétylcholine »? Du fait que les récepteurs auront également la possibilité d'entrer en réaction avec l'une et l'autre des deux substances, « vraie » et « fausse » acétylcholine, il résultera que la probabilité de réagir de la « vraie acétylcholine » sera diminuée dans la proportion de $1/2$ ou encore que la quantité d'acétylcholine vraie susceptible de manifester un effet contracturant sera représentée par la moitié de la quantité d'acétylcholine réellement présente; elle correspondra à $(2x)\frac{1}{2} = (x)$ et la hauteur de la contraction consécutive à l'addition du mélange sera équivalente à la contraction h que provoquait déjà, solution initiale d'acétylcholine de concentration (x).

En généralisant le raisonnement précédent, on peut indiquer que, voulant constamment rejoindre l'effet d'une quantité (x) d'acétylcholine, en ajoutant à la solution une dose d'acétylcholine supérieure ($n x$), il sera dans chaque cas nécessaire de diminuer la probabilité de réagir de cette dose, en introduisant dans la solution un nombre de molécules de la « fausse acétylcholine » tel que la quantité d'acétylcholine représente le $\frac{1}{n}$ e du nombre total des molécules; la quantité de substances actives apparaît en effet dans ce cas constante et égale à (x) :

$$(n x) \times \frac{1}{n} = (x)$$

La table suivante indique, par quelques exemples, quels seront dans ce cas les accroissements de quantité de fausse acétylcholine nécessaire, pour que l'effet du mélange soit constamment égal à celui d'une concentration (x) d'acétylcholine.

Acétylcholine vraie (x)	Fausse Acétylcholine (y)
x	0
2 x	2 y
4 x	12 y
8 x	56 y
16 x	240 y
32 x	992 y

D'une manière générale, il correspond au terme $n x$ une valeur $n(n - 1) y$.

Toujours dans le cadre de l'hypothèse proposée où l'acétylcholine « vraie » et la « fausse acétylcholine » présenteraient pour les récepteurs une même affinité, on suppose que les valeurs de x et de y sont égales; dans le cas contraire, on peut facilement déduire le rapport $\frac{x}{y}$, en tenant compte des résultats de l'expérience réalisés avec une concentration $2 x$ d'« acétylcholine vraie » et $2 y$ de la « fausse acétylcholine ».

Il apparaît dès lors que les rapports entre les deux substances antagonistes obéissent à des lois bien différentes suivant le type de l'antagonisme envisagé.

Selon le concept de l'antagonisme compétitif qui vient d'être développé la quantité de l'inhibiteur nécessaire pour réduire n fois l'effet d'une quantité déterminée x de l'effecteur, varie dans le rapport (1) :

$$\text{Inh.}_n = \frac{n(n-1)}{2} \text{Inh.}_2 \quad (1)$$

alors que dans le cas de l'antagonisme irréversible, le même phénomène est représenté par l'équation :

$$\text{Inh.}_n = \frac{n}{2} \text{Inh.}_2 \quad (2)$$

Les expériences qui concernent l'antagonisme exercé par le 2559 F. vis-à-vis de l'acétylcholine sur le muscle droit de la grenouille, sans répondre entièrement aux exigences d'une réaction parfaitement compétitive, obéissent à une relation mathématique suffisamment voisine de celle que fournirait l'équation (1).

On peut observer à ce sujet que les deux équations (1) et (2) peuvent être considérées comme les cas particuliers d'une formule plus générale :

$$\text{Inh.}_n = \frac{n}{2} (n-1)^k \text{Inh.}_2 \quad 0 \leq k \leq 1 \quad (3)$$

dans lequel k figure un coefficient empirique.

(1) Inh._n = quantité de l'inhibiteur nécessaire pour que l'effet d'une dose ($n x$) de l'effecteur se ramène à la réaction provoquée par la dose (x).

Inh._2 = quantité de l'inhibiteur nécessaire pour que l'effet d'une dose ($2 x$) de l'effecteur se ramène à la réaction provoquée par la dose (x).

L'équation de l'antagonisme par combinaison stable correspondra à une valeur $k = 0$, tandis que l'équation de l'antagonisme parfaitement compétitif correspond à la valeur $k = 1$.

Le cas qui par la pratique paraît le plus fréquent, où l'antagonisme pharmacologique n'obéit parfaitement à aucune des deux équations, peut dans cette hypothèse correspondre aux valeurs intermédiaires du même coefficient. On a effectivement constaté que, en introduisant dans l'équation (3) une valeur $k = 0,66$, on parvient à des valeurs suffisamment approchées des résultats de l'expérience.

Concentration de 2559 F. et d'acétylcholine dont l'addition est susceptible de reproduire l'effet d'une même dose (0,4 mg/l) d'acétylcholine

		2559 F. (mg/l)		
Acétylcholine (mg/l)	Trouvé	Calculé selon $\text{Inh.}_n = \frac{n}{2} (n-1)^k \text{Inh.}_2$		
		$k = 0$ Antagonisme par combinaison stable	$k = 1$ Antagonisme par- faitement compétitif	$k = 0,66$
0,8	1,9	1,9	1,9	1,9
1,6	9	3,8	11,4	7,8
4	40	9,5	85,5	40,4
6,4	80	15,2	228	90,7

Ce fait peut être mis en rapport avec l'action relativement labile du 2559 F. sur le muscle de la grenouille et peut-être aussi avec l'observation que l'on peut reconnaître un plan commun aux molécules d'acétylcholine et de 2559 F.

Les faits exposés représentent une méthode précise de la mesure de la fixation de l'antagoniste au récepteur, phénomène qui a été récemment analysé par ROCHA et SILVA (7) qui a utilisé une technique entièrement différente.

Le cas de l'antagonisme parfaitement compétitif est un cas limite qui ne répond entièrement jusqu'ici à aucune donnée expérimentale. Il apparaît cependant qu'il est susceptible d'expliquer les anomalies apparentes qui n'obéissent plus au cas également extrême de l'antagonisme irréversible.

En dehors du 2559 F. les couples d'antagonistes néoantergan/histamine et dolantine/acétylcholine représenteraient d'autres cas, où l'antagoniste n'établit avec le récepteur qu'une liaison relativement labile et où s'établit entre effecteur et inhibiteur un antagonisme qui n'est qu'en partie compétitif.

Le critère de pA_x devant permettre d'attribuer un indice correspondant à la puissance de l'antagonisme exercé des substances de types très divers, il apparaît à la lumière des faits précédemment rapportés qu'il sera utile de lui adjoindre dans chaque cas l'indication de la concentration de la substance active mise en œuvre.

Ayant éliminé de la sorte la possibilité des écarts dus à l'emploi des différentes doses d'effecteurs, l'indice pA_x de SCHILD présentera une plus grande précision et une valeur plus générale dans la comparaison et la classification des produits antagonistes.

RÉSUMÉ

L'antagonisme entre un curare de synthèse (2559 F., triiodoéthylate de tri-(β -diéthylaminoéthoxy)_{1,2,3}-benzène) et l'acétylcholine revêt, sur la préparation du muscle droit abdominal de grenouille qui s'est démontré un matériel parfaitement adéquat à une telle étude, un type particulier dans lequel l'effet d'une dose fixe de la substance antagoniste est susceptible de varier dans une large mesure selon la concentration utilisée de la substance active.

L'analyse du phénomène dont on a proposé une expression mathématique, a révélé qu'il pouvait s'interpréter en partie comme une réaction d'équilibre entre les deux substances; la présence simultanée d'un antagonisme dit de *combinaison stable* avec un antagonisme *compétitif* est également susceptible de fournir de plusieurs données citées par la littérature, une représentation approchée.

On a reconnu par ailleurs que la notion de pA_x ne s'applique pas intégralement aux antagonistes du type compétitif et qu'il peut y avoir intérêt à joindre dans certains cas, à l'indice lui-même, l'indication de la concentration utilisée de l'effecteur.

SUMMARY

The antagonism between a synthetic curare (2559 F.) (triiodoethylate of tri-(β -diethylaminoethoxy)_{1,2,3}-benzene) and acetylcholine for which preparations of abdominal muscle of the frog have been shown to be a perfectly adequate material in this study, shows a particular type of reaction in which the effect of a fixed dose of the antagonistic substance is susceptible to large variations according to the concentration of active substance utilised.

The analysis of this phenomenon, for which a mathematical expression has been proposed, has suggested that it may be interpreted in part as an equilibrium reaction between the two substances; the simultaneous presence of an antagonism of stable combination with a competitive antagonism is susceptible to adequately explain many other examples quoted in the literature.

It has been recognised on the other hand that the idea of pA_x cannot be entirely applied to antagonisms of competitive type and that it may be necessary to add to this index in certain cases, the indication of the concentration of the active substance used.

BIBLIOGRAPHIE

1. — H. O. SCHILD. *Brit. J. Pharmacol.*, 1947, 2, 189.
2. — A. J. CLARK et J. RAVENTÒS. *Quart. J. exp. Physiol.*, 1937, 26, 375.
3. — J. J. REUSE. *Brit. J. Pharmacol.*, 1948, 3, 174. *Ann. Soc. Roy. Sces médic. et natur. de Bruxelles*, 1949, 2.
4. — S. GUARINO. *Rend. Istituto Sup. Sanità, Roma*, 1949, 12, 198.
5. — D. BOVET, F. DEPIERRE et Y. DE LESTRANGE. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1947, 225, 74.
6. — S. GUARINO et D. BOVET. *Rend. Istituto Sup. Sanità, Roma*, 1949, 12, 215.
7. — M. ROCHA e SILVA et W. T. BERALDO. *J. Pharmacol.*, 1948, 93, 457.

RECHERCHES SUR LES POISONS CURARISANTS DE SYNTHÈSE

II^{me} Partie

Éthers phénoliques à fonction ammonium quaternaire
Action du tri-iodoéthylate de tri(diéthylaminoéthoxy) benzène
(2559 F.) ⁽¹⁾

PAR

DANIEL BOVET ⁽²⁾, FRANCE DEPIERRE, SIMONE COURVOISIER
ET YVONNE DE LESTRANGE

(Travail reçu le 17-2-1949).

INTRODUCTION

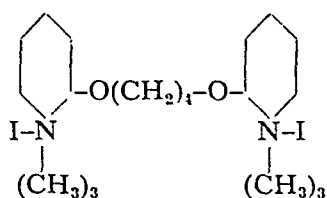
Au cours de nos recherches sur les produits de synthèse présentant des propriétés curarisantes, recherches dont le point de départ avait été, comme nous l'avons indiqué dans la première partie de ce mémoire (1), la constitution de la *d*-tubocurarine elle-même, nous avons été amenés à examiner l'action sur le muscle strié des éthers-oxydes que forment, avec les phénols, la choline et les aminoalcools homologues.

L'un des premiers composés que nous avons étudiés, le diiodométhylate de bis(β -diméthylammonium-éthoxy)-4-4'-diphényle (B) se trouve être précisément un isomère du diiodométhylate de bis(diméthylamino-2-2'-phénoxy)-1-4-butane (A), dont l'activité a été envisagée dans le travail précédent.

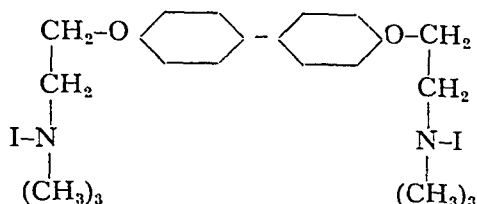
Les deux molécules, quoique très différentes, renferment l'une et l'autre deux noyaux benzéniques; elle contiennent les mêmes fonctions éthers oxydes, les mêmes radicaux ammonium quaternaires; on a constaté qu'elles exercent chez l'animal des effets physiologiques analogues.

⁽¹⁾ Note préliminaire: D. BOVET, F. DEPIERRE et Y. DE LESTRANGE. *C. R. Ac. Sc.*, 1947, 223, 74.

⁽²⁾ Adresse actuelle: Laboratorio di Chimica Terapeutica, Istituto Superiore di Sanità, Roma (Italia).



A



B

Dose curarisante

(lapin i.v.) . . . 0,5 mg./kg.

. 2 mg./kg.

La suite de nos recherches nous a conduits à constater l'existence de l'action curarisante particulièrement élective des éthers des polyphénols, pyrocatechine, résorcine, hydroquinone et pyrogallol.

Les éthers formés par condensation des aminoalcools et des phénols ont fait l'objet de nombreuses investigations dans les domaines les plus divers de la pharmacologie ⁽¹⁾. Les effets anesthésiques locaux, assez fréquents dans la série des éthers phénoliques qui se rapprochent par là des esters benzoïques, ont donné lieu à plusieurs brevets dont le premier remonte à 1906. E. FOURNEAU, en 1910, a signalé dans le groupe des propriétés antithermiques.

Dans le domaine des poisons du système nerveux végétatif, il a été constaté avec différents termes de la série, des effets ocytociques, sympatholytiques, sympathomimétiques, un antagonisme vis-à-vis de la fibrillation cardiaque et une activité antihistaminique.

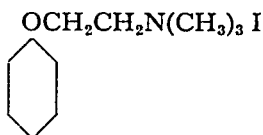
Les premiers éthers des polyphénols paraissent avoir été préparés par DRUEY (2) en 1936 et par STRICKLER (3) en 1938, mais l'étude de ces amines tertiaires, réalisée à cette époque par l'un de nous dans le Laboratoire de Chimie Thérapeutique de l'Institut Pasteur, ne permit de mettre en évidence aucune propriété pharmacologique très caractéristique; l'action sympatholytique des diéthers des diphénols était en particulier plus restreinte que celle des monoéthers phénoliques correspondants.

C'est en 1929 que HUNT et RENSHAW ont étudié les premiers éthers phénoliques à fonction ammonium quaternaire.

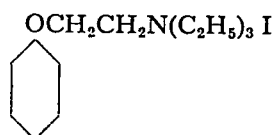
Dans deux publications successives, les auteurs ont, en particulier, reconnu l'activité essentiellement hypertensive et nicotinique de l'éther phénolique de la choline [iodométhylate de β -diméthylaminoéthoxy-

(1) Nous avons fait figurer dans l'ouvrage suivant une bibliographie étendue concernant les propriétés pharmacodynamiques des éthers phénoliques : D. BOVER et F. BOVER-NITTI, Structure et activité pharmacodynamique des médicaments du système nerveux végétatif, Karger, Bâle, 1948.

benzène, ou phénoxycholine (I)] qui manifeste une activité voisine de



I



III

celle de la nicotine elle-même, (4) puis les propriétés de l'iodoéthylate de β -diéthylaminoéthoxybenzène (III) (5).

Les deux produits ont été examinés par HUNT au seul point de vue des effets muscariniques, excitants nicotiniques ou paralysants nicotiniques qu'ils étaient susceptibles d'exercer sur le système neuro-végétatif. Nous en avons fait le point de départ d'une série de dérivés nouveaux dont la synthèse a été réalisée par l'un d'entre nous (6) et dont on a examiné, dans le travail qui suit, les effets qu'ils exercent sur la transmission neuro-musculaire.

- | | |
|---|---|
| I — $\text{C}_6\text{H}_5\text{O} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3 \text{ I}$ | = iodométhylate de diméthylaminoéthoxybenzène |
| II — $1,3\text{-C}_6\text{H}_4(\text{O} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3 \text{ I})_2$ | = diiodométhylate de bis(diméthylaminoéthoxy)-1,3-benzène. |
| III — $\text{C}_6\text{H}_5\text{O} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3 \text{ I}$ | = iodoéthylate de diéthylaminoéthoxybenzène. |
| IV — $1,2\text{-C}_6\text{H}_4(\text{O} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3 \text{ I})_2$ | = diiodoéthylate de bis(diéthylaminoéthoxy)-1,2-benzène. |
| V — $1,3\text{-C}_6\text{H}_4(\text{O} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3 \text{ I})_2$ | = diiodoéthylate de bis(diéthylaminoéthoxy)-1,3-benzène. |
| VI — $1,4\text{-C}_6\text{H}_4(\text{O} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3 \text{ I})_2$ | = diiodoéthylate de bis(diéthylaminoéthoxy)-1,4-benzène. |
| VII — $1,2,3\text{-C}_6\text{H}_3(\text{O} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3 \text{ I})_3$ | = triiodoéthylate de tri-(diéthylaminoéthoxy)-1,2,3-benzène (2559 F). |

C'est au dernier de ces produits dont les propriétés nous ont paru spécialement remarquables, que nous nous sommes particulièrement arrêtés.

Le 2559 F, depuis la publication de notre note préliminaire (1), a fait l'objet également des recherches de DEPIERRE (7), de VAN DEN OSTENDE (8), de WIEN (9) et de BULBRING et DEPIERRE (10).

Le produit représente aussi le premier curare de synthèse qui ait été utilisé en médecine humaine comme adjuvant de l'anesthésie, à la suite des diverses expérimentations cliniques de HUGUENARD et BOUÉ, de HUGUENARD (11), et de MAZZONI, BAISI et LONGO (12) (1).

(1) Le 2559 F, étudié également sous le n° 3697 R.P., a été introduit en pratique chirurgicale en France sous le nom de « Flaxedil » par la Société Parisienne d'Expansion chimique Spécia, et en Italie, sous la dénomination de « Sincurarina », par la Société Farmitalia de Milan.

PROPRIÉTÉS DES ÉTHERS PHÉNOLIQUES À FONCTION
AMMONIUM QUATERNAIREA. — *Éthers de la Choline.*

I — Ainsi qu'il a été rappelé plus haut, les propriétés pharmacodynamiques de l'éther que forme la choline avec le monophénol, l'iodométhylate de β -diméthylaminoéthoxy-benzène ou phénoxycholine (formule I, p. 457), ont déjà été rapportées par HUNT et RENSHAW (4) (5).

L'injection au chien chloralosé est suivie d'une hypertension et de polypnée aux doses faibles, d'une hypotension aux doses élevées. Ces faits ont été interprétés comme la démonstration de l'activité nicotinique du composé; les faibles doses agissent en stimulant simultanément les ganglions sympathiques et l'adrélinosécrétion : à la suite de l'injection de doses élevées, il survient, comme après la nicotine, une paralysie ganglionnaire.

Les effets tensionnels de la phénoxycholine sont à peu près aussi intenses que ceux de la nicotine elle-même, et la dose qui provoque une paralysie ganglionnaire est elle aussi du même ordre de grandeur pour les deux produits.

Bien qu'on ait déjà reconnu à la phénoxycholine une toxicité relativement élevée, le mécanisme de l'intoxication n'avait pas été établi. Chez le chien nous avons constaté que l'injection d'une dose de 2 ou 5 mg s'accompagnait déjà d'une paralysie de la transmission synaptique au niveau des muscles striés. La cause de la mort serait par conséquent, pour la phénoxycholine comme pour la nicotine, attribuable à une curarisation et à une paralysie des centres respiratoires évoluant parallèlement.

Chez le lapin, et particulièrement lorsque l'animal est soumis à la respiration artificielle, la curarisation apparaît avec une particulière netteté. Par voie intraveineuse, la dose toxique est de 4 mg/kg; à la suite de l'injection de 40 mg l'animal reste curarisé pendant 40 minutes environ.

Quoique manifestant des propriétés curarisantes aisément reconnaissables, la phénoxycholine ne représente cependant pas un poison curarisant typique, car l'activité qu'elle manifeste par ailleurs sur le système cardio-vasculaire est trop importante pour qu'il soit possible de la considérer comme un substitut des alcaloïdes naturels du curare.

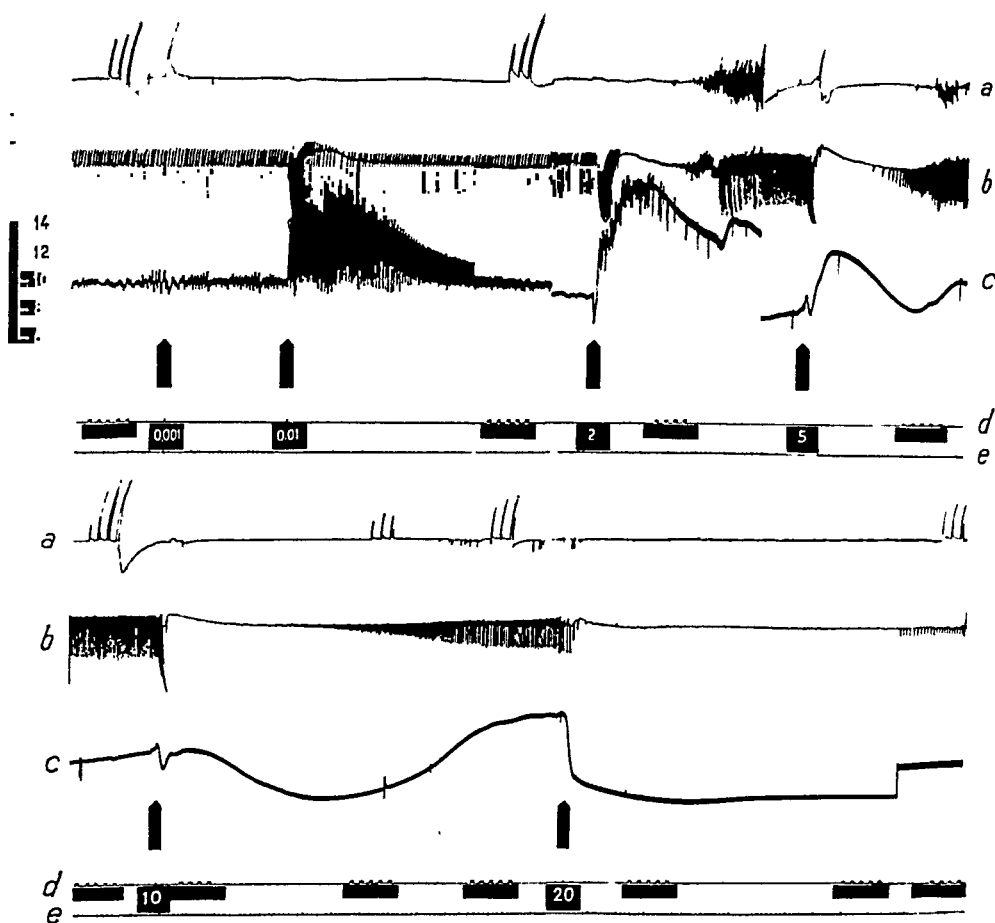


FIG. 1

Action de l'iodométhylate de diméthylaminoéthoxybenzène (phénoxycholine) sur la transmission neuro-musculaire, les mouvements respiratoires et la pression artérielle du chien

A dose faible (0,01 mg/kg) la phénoxycholine provoque les effets typiquement nicotiques décrits par HUNT et RENSHAW : hypertension brutale et augmentation simultanée de la fréquence et de l'amplitude respiratoire.

L'action dépressive sur la transmission neuro-musculaire commence à devenir manifeste aux doses de 2 et 5 mg. Elle est particulièrement visible aux doses élevées (10 et 20 mg), à la suite desquelles la curarisation évolue parallèlement sur le muscle gastrocnémien et sur la motilité respiratoire.

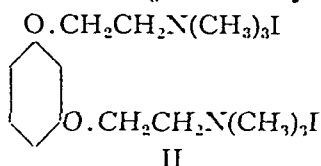
a. — Contraction du muscle gastrocnémien mis à nu, consécutive à l'excitation électrique du sciatique par des courants d'intensité croissante.

b. — Mouvements respiratoires; pendant la phase de paralysie musculaire complète, l'hématose est assurée par un courant d'oxygène porté par une sonde directement au niveau des grosses bronches.

c. — Pression artérielle.

d. — Stimulations du nerf sciatique et injections d'iodure de phénoxycholine (mg/kg).

e. — Temps (10 sec.).

II — Le diiodométhylate de bis(β -diméthylaminoéthoxy)-1,3-benzène

(II) manifeste aux mêmes doses (2 à 5 mg/kg i.v.) un effet curarisant exactement superposable à celui du dérivé du monophénol. Chez le chien cependant, les effets tensionnels hypotenseurs du dérivé diammonium (II) sont bien moins marqués puisqu'il faut injecter par voie i.v. une dose de 5 mg/kg pour entraîner une réaction comparable à celle que provoque 0,1 mg de phénoxycholine (I).

Le diiodométhylate de bis-(diméthylaminoéthoxy)-1,3-benzène est toxique, comme la phénoxycholine, à la dose de 4 mg/kg (voie i.v.) pour le lapin.

B. — Éthers de l'hydrate de triéthyléthanolammonium.

III — Le contraste que présentent, avec les effets tensionnels de la phénoxycholine, ceux qu'exerce l'iodoéthylate de β -diéthylaminoéthoxybenzène (formule III, p. 174) a été signalé en 1933 déjà par HUNT et RENSHAW (4) qui l'ont à juste titre comparé à l'opposition qui sépare

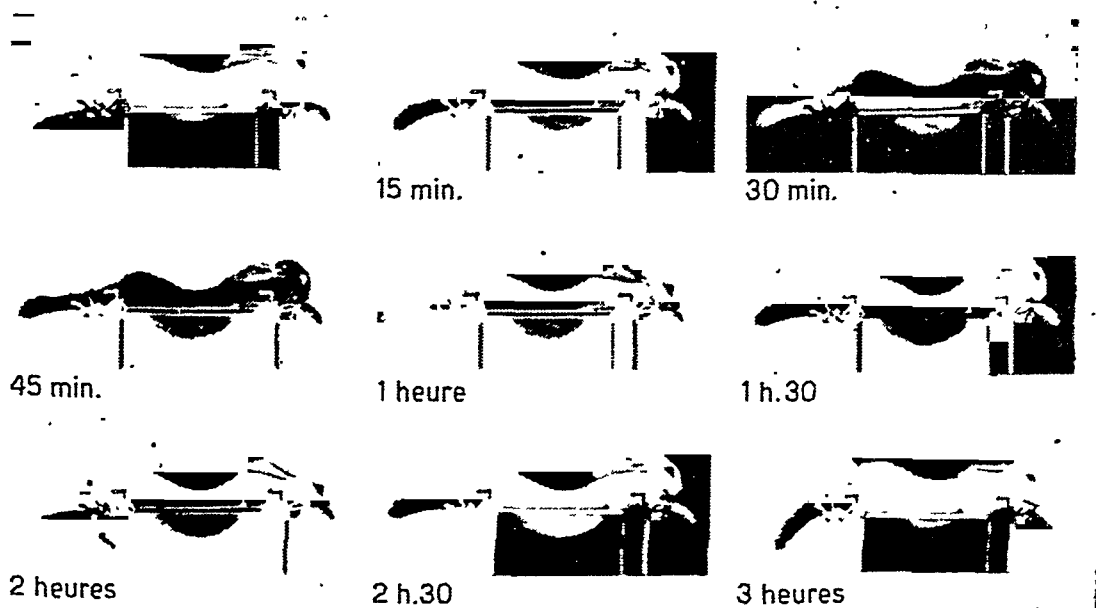


FIG. 2

Action du triiodoéthylate de tri-(diéthylaminoéthoxy)-1,2,3-benzène (2559 F) sur le lapin. Injection d'une dose de 2 mg/kg par voie sous-cutanée

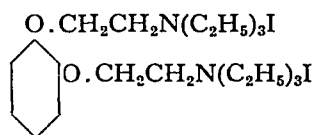
L'effet du curare se traduit en dehors de la réaction « head-drop » par un relâchement de la paroi abdominale. L'effet, visible après 15 minutes, atteint son maximum une heure après et se prolonge environ pendant trois heures.

les effets des sels de tétraméthylammonium et de tétraéthylammonium.

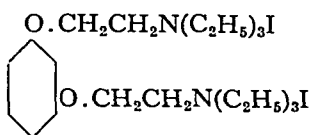
L'iodoéthylate de β -diéthylaminoéthoxy-benzène (III), qui représente l'éther phénolique d'un aminoalcool — l'hydrate de triéthyléthanolammonium — volontiers désigné par les pharmacologues sous le nom de « triéthylcholine », apparaît en effet, contrairement à la phénoxycholine, comme très peu toxique; il ne provoque ni polypnée, ni hypertension aux faibles doses et manifeste seulement une action hypotensive et nicotinique paralysante à partir de 1-2 mg/kg.

Nos propres observations, en plus de la confirmation qu'elles apportent des résultats obtenus par HUNT et RENSHAW, permettent d'indiquer que le produit n'exerce qu'une action curarisante extrêmement réduite. Il faut en injecter 40 à 50 mg/kg au chien pour obtenir l'interruption de la conduction synaptique, à une dose qui, par ailleurs, provoque une hypotension profonde et durable. Chez le lapin, la dose curarisante head-drop (10 mg/kg) est encore cinq fois supérieure à celle de l'éther phénolique de la choline (I).

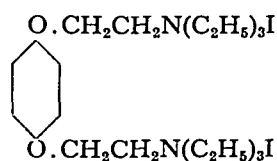
IV — V — VI — Les trois diéthers que forment l'iodure de l'hydrate de β -triéthyléthanolammonium avec les trois diphénols isomères ont été comparés à l'iodoéthylate de β -diéthylaminoéthoxy-benzène (III).



IV



V



VI

À des degrés un peu différents, le diiodoéthylate de bis(diéthylaminoéthoxy)-1,2-benzène (IV), le diiodoéthylate de bis-(diéthylamino)-1,3-benzène (V) et le diiodoéthylate de bis-(diéthylaminoéthoxy)-1,4-benzène (VI) manifestent tous trois, par rapport à l'éther phénolique correspondant, des effets tensionnels moins marqués et une action singulièrement accrue sur la transmission neuro-musculaire.

Chez le lapin, la dose curarisante toxique est, pour l'éther de la pyrocatechine (IV): de 1,5 mg; pour l'éther de la résorcine (V): 1 mg; pour l'éther de l'hydroquinone (VI): de 3,5 mg. Les trois produits exercent aux mêmes doses des effets analogues chez le chien.

Le contraste enfin que l'on rencontre entre les propriétés des éthers monophénoliques et diphénoliques de l'hydrate de triéthyléthanolammonium nous a, à ce point de nos recherches, incités à étudier également l'éther d'un triphénol. Nous sommes par cette voie parvenus au dérivé 2559 F.

ACTIVITÉ CURARISANTE DU TRIODOÉTHYLATE DE TRI(β -DIÉTHYLAMINO-ÉTHOXY)-1,2,3,-BENZÈNE (2559 F)

Le triiodoéthylate de tri-(β -diéthylaminoéthoxy)-1,2,3-benzène est un poison curarisant sur la grenouille qu'il paralyse à la dose de 10 mg/kg en injection s.c., témoignant d'une activité curarisante 20 fois moins intense que celle de la *d*-tubocurarine; celle-ci, d'après KING (13), paralyse la grenouille à 0,5 mg/kg.

Sur la préparation du rectus abdominal isolé de grenouille, le 2559 F se montre de même environ 20 fois moins actif que la *d*-tubocurarine comme antagoniste de la contracture provoquée par l'acétylcholine.

Par voie i.v., chez la souris et chez le rat, le 2559 F est peu toxique (TABLEAU I). Chez le lapin, le chien et chez le chat (10) il se révèle par contre un curarisant actif, environ 3 à 4 fois moins efficace cependant que la *d*-tubocurarine (FIG. 2).

Sur le tibial antérieur du chat (10) préparé d'après la technique de BROWN (14) il prévient la contraction du muscle stimulé par une injection artérielle proche d'acétylcholine à une dose légèrement inférieure à la dose curarisante.

Les essais réalisés sur le lapin soumis à la respiration artificielle permettent de mettre en évidence la durée et le caractère électif de l'action que le produit exerce sur les muscles striés.

L'injection i.v. de 6,5 mg de produit provoque une paralysie qui dure 2 h. 40; l'injection de 32,5 mg une paralysie de 6 h., et il faut injecter

TABLEAU I

mg/kg			Voie i.v.	Voie i.m.	Voie ss-cut.	Voie bucc.
2559 F	grenouille	D. curar.			10	
	souris	D. tox. 50	4,5		15	425
	rat	D. tox. 50	5,5		25	
	lapin	D. curar.	0,5	0,75	1,5	
		D. tox. 50	0,65	2-3	2-3,5	100
	chien	D. curar.	0,4			
		D. tox. 50	0,8			
<i>d</i> -Tubocurarine	grenouille	D. curar.			0,50	
	souris	D. tox. 50	0,25		1,25	
	lapin	D. curar.	0,15		0,5	
		D. tox. 50	0,16			
	chien	D. curar.	0,2			
		D. tox. 50	0,5			

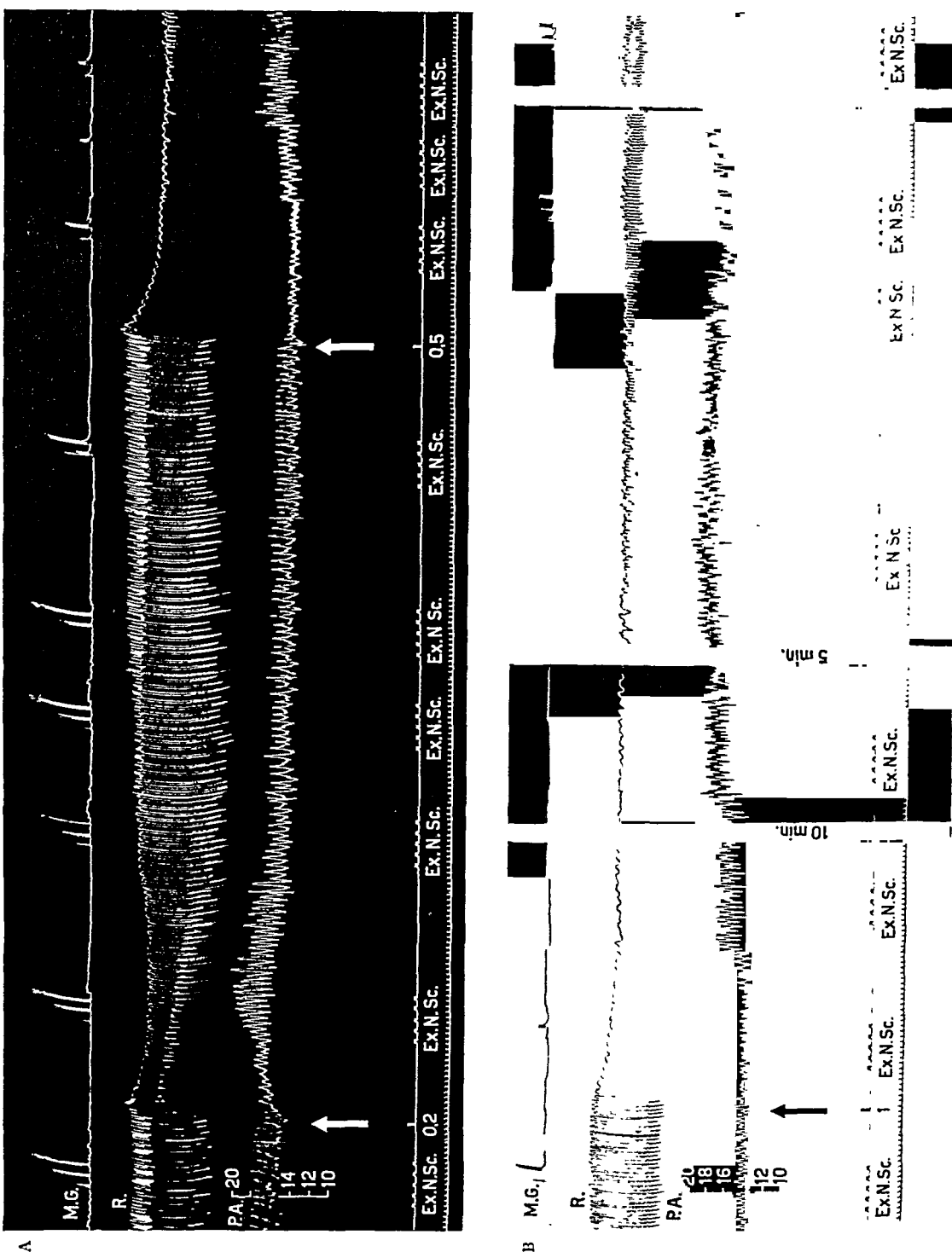


FIG. 3. — Action curarisante du 2559 F chez le chien

On observe, à la suite de l'injection de 2559 F :

— à la suite 0,2 mg/kg : une diminution transitoire de l'amplitude respiratoire ;
— après 0,5 mg/kg : un arrêt des mouvements respiratoires qui s'accompagne d'une diminution considérable de l'excitabilité indirecte du muscle ;

— et enfin après 10 mg/kg : la disparition de la réponse du muscle gastrocnémien.

Le retour à la respiration et à une excitabilité normale s'établit progressivement ensuite.

Les conditions expérimentales sont celles mêmes qui ont été décrites dans la légende de la fig. 1 ; là encore l'hématose a été assurée par un courant d'oxygène pur pendant toute la phase de paralysie respiratoire.

On notera en particulier l'absence de réaction tensionnelle par des doses de 2559 F qui provoquent une curarisation complète, et, alors même que l'amplitude de mouvements est très atténuée, la constance du rythme qui témoigne de l'intégrité du centre respiratoire.

300 mg, c'est-à-dire environ 500 fois la dose mortelle, pour tuer dans un délai de quelques heures un lapin dont la ventilation pulmonaire est assurée par une pompe.

On constate chez le chien, également, que l'action curarisante de 2559 F se manifeste en dehors de toute action toxique; on observe seulement une suppression de l'excitabilité vagale qui apparaît dès 1 à 2 mg/kg. Le produit de synthèse se trouve, à cet égard, très supérieur aux curares naturels.

TABLEAU II

Durée de la curarisation consécutive à l'injection i.v. au lapin de 2559 F et tolérance de l'animal aux doses élevées

Doses en mg/kg	Nombre de doses	Durée de la curarisation
6,5	10	2 h. 40
32,5	50	6 h.
65	100	> 8 h.
130	200	> 8 h.
195	300	> 8 h.
260	400	> 8 h.
325	500	mort en 3 h.

Assurant l'hématose des chiens placés sous narcose au moyen d'un courant d'oxygène qu'une sonde amenait directement au contact des bronches, nous avons pu enregistrer les différentes phases de la paralysie sans courir le risque de voir les réactions asphyxiques affecter le tracé tensionnel.

On constate dans ces conditions, après l'injection i.v. d'une dose de 0,2 mg/kg, une diminution passagère de l'amplitude des mouvements respiratoires et une paralysie respiratoire après une administration de 0,5 et 1 mg/kg (FIG. 3).

L'enregistrement de la réponse mécanique du muscle gastrocnémien mis à nu aux excitations d'intensité croissante du bout périphérique du nerf sciatique, permet d'ailleurs d'enregistrer au niveau de la musculature striée des extrémités une diminution progressive de l'excitabilité indirecte; celle-ci a généralement disparu 2 minutes environ après l'injection de 1 mg de 2559 F.

On doit considérer comme particulièrement remarquable le fait que dans ces conditions, la pression carotidienne n'est aucunement affectée par les doses moyennes du curare. L'injection brutale d'une dose de 5 mg, susceptible de produire la curarisation complète de l'animal

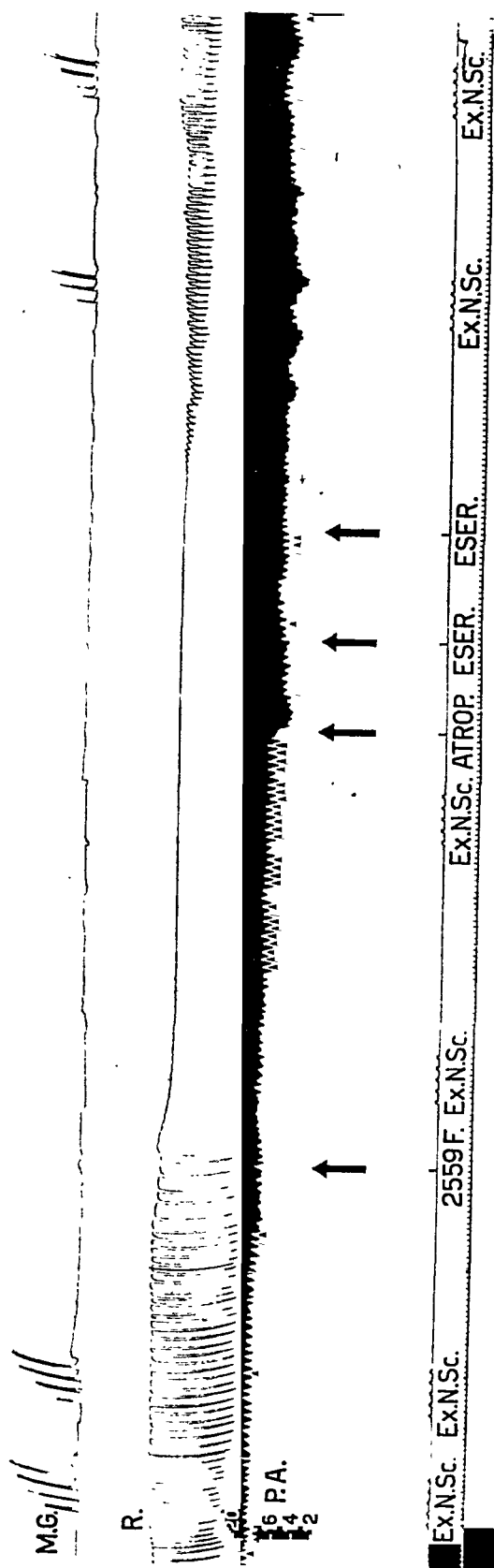


FIG. 4
Action d'atropine sur l'activité électrique du chien, par le 2559 F

En A injection de 2 mg/kg de 2559 F.
B injection de 1 mg/kg d'atropine.
C et D : injections de 1 mg/kg d'ésérine.

Dans des conditions expérimentales semblables à celles qui ont été représentées dans la fig. 1, la curarisation consécutive à l'injection d'une dose de 2 mg/kg de 2559 F, qui aurait dû normalement se prolonger pendant 1 à 2 heures, regresse progressivement à la suite de l'injection i.v. au chien — préalablement atropinisé — de 2 mg/kg d'ésérine.

pendant plus de 3 heures, ne provoque aucune réaction tensionnelle. Il faut atteindre 10 mg/kg pour obtenir le faible crochet d'une hypotension passagère.

L'action décurarisante de l'ésérine a pu être mise en évidence dans nos essais non seulement chez le chien (FIG. 4) mais aussi dans les conditions rapportées par KOPPANYI et VIVINO (15) chez le lapin, et dans les expériences réalisées chez la souris.

Nous reproduisons ici (TABLEAU III) le protocole d'un essai réalisé avec ce dernier animal.

TABLEAU III

Effet protecteur de l'ésérine au cours de l'intoxication de la souris par le 2559 F

Les produits sont administrés par voie sous-cutanée; l'atropine et l'ésérine préventivement 15 min. avant la dose toxique de 2559 F

2559 F mg/kg	Atropine (100 mg/kg) + ésérine mg/kg	Mortalité
15		4/4
15	0,25	1/4
15	0,5	1/4
15	1,0	0/4
22,5	1,0	0/4
25	1,0	0/4
27,5	1,0	0/4
30	1,0	4/4

Les différentes expériences de contrôle réalisées montrent que le 2559 F, en dehors de l'action curarisante qu'il exerce, ne manifeste aucune activité particulière sur les muscles lisses; il n'exerce aucune action sur l'intestin isolé du lapin à la concentration de 1 mg/litre; il n'agit pas sur la musculature bronchique; instillé dans l'œil du chat (1 %) il ne provoque pas de constriction du muscle irien.

Nous avons déjà signalé que, jusqu'à concurrence de 10 mg/kg le produit n'exerce pas d'effet tensionnel; il ne modifie non plus d'une manière significative ni l'hypertension adrénalinique, ni l'effet tensionnel de l'adrénaline.

La régularité avec laquelle on assiste à un retour progressif à une respiration normale, sans que le rythme respiratoire paraisse lui-même à aucun moment altéré, constitue déjà un signe précieux en faveur de l'intégrité des centres chez l'animal curarisé par le 2559 F.

Reprenant, au cours des expériences réalisées sur le lapin, une obser-

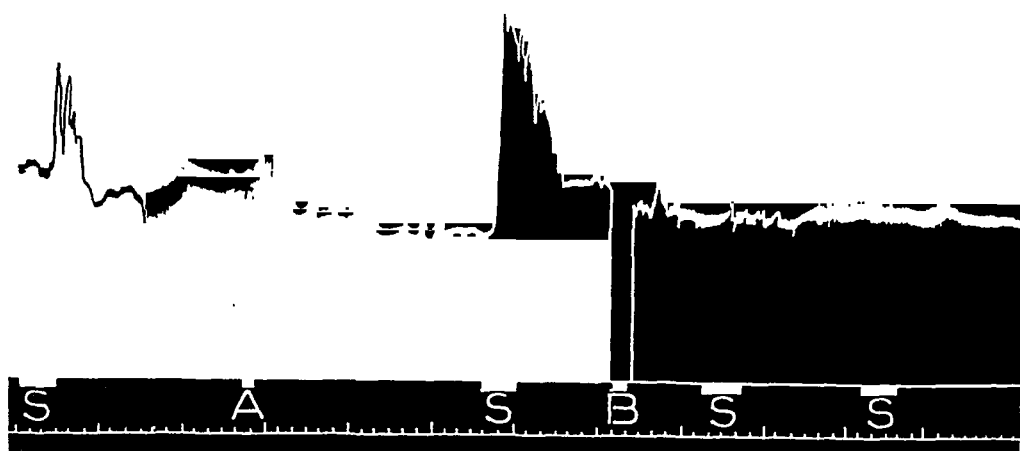


FIG. 5

Intégrité des centres au cours de la curarisation

On observe chez le lapin la persistance, malgré la curarisation (A : 2559 F, 2 mg/kg), de la réaction hypertensive consécutive à une excitation électrique douloureuse de la base de l'oreille (S); celle-ci ne disparaît qu'à la suite de l'injection (en B) d'une solution anesthésique d'uréthane (500 mg/kg).

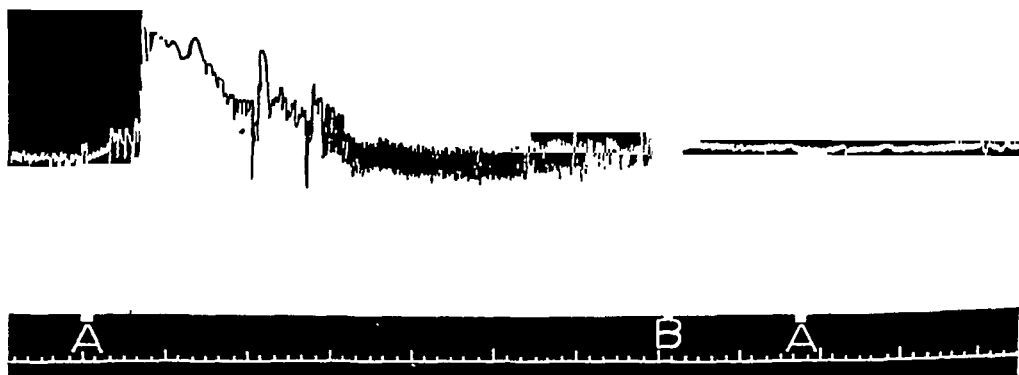


FIG. 6

Intégrité des centres au cours de la curarisation

L'injection intraveineuse de 2559 F chez le lapin en A (2 mg/kg) provoque une sensation douloureuse qui se traduit, malgré la complète paralysie de l'animal, par une réaction hypertensive.

On observe dans la suite de l'expérience que cette réaction à la douleur ne se produit plus après qu'on a ajouté à l'effet du curare celui de l'anesthésique (en B : uréthane, 500 mg/kg i. v.).

vation formulée par TILLIE (16) en 1897, nous avons pu constater que l'arc sensible était, lui aussi, respecté par le curare de synthèse.

Dans l'expérience qui est reproduite à la fig. 6, usant du fait que chez le lapin non anesthésié l'électrisation de la base de l'oreille par un courant faradique provoque une réaction douloureuse qui est régulièrement suivie d'une réaction hypertensive, on a constaté que l'injection de 2559 F, à dose largement suffisante pour provoquer une curarisation complète, exagérait plutôt la réponse tensionnelle due à l'excitation électrique; à l'opposé l'anesthésie par l'uréthane, supprime totalement la réponse au stimulus sensible.

Un autre essai montre que l'hypertension consécutive à l'injection du 2559 F chez le lapin non anesthésié (FIG. 5) constitue elle-même une réaction douloureuse que prévient la narcose.

Il est ainsi possible, dans une expérience très simple, de montrer que la notion bernardienne de l'intégrité des centres au cours de la curarisation, depuis longtemps reconnue aux curares naturels, peut s'appliquer aussi aux curares de synthèse.

DISCUSSION

L'étude des propriétés curarisantes des éthers phénoliques appelle quelques commentaires.

En premier lieu, elle apporte une confirmation de l'hypothèse développée dans la première partie de notre travail (1), en ce qui concerne l'élément favorable représenté dans la synthèse des nouveaux curares par la pluralité des fonctions ammonium quaternaires dans la même molécule.

Considérant le cas des éthers de l'hydrate de triéthyléthanol ammonium, on a, en particulier, constaté que les polyéthers manifestaient des propriétés curarisantes plus marquées et des effets tensionnels secondaires moins apparents que l'hydrate de triéthylaminoéthoxybenzène.

Il semble qu'il s'agisse là d'une notion assez générale puisque, depuis que nous l'avons formulée, d'autres faits, encore, sont venus la confirmer. A côté de la découverte par BARLOW et ING (17), et par PATON et ZAIMIS (18) des propriétés curarisantes des termes supérieurs de la série des sels de polyméthylène bis-triméthylammonium, et des observations faites par l'un de nous dans la série des esters des polyacides aromatiques (19) et aliphatiques (20), on pourra citer l'observation inverse de CRAIG (21) qui, prenant la molécule de la *d*-tubocurarine

pour point de départ de ses recherches, a observé la relative inactivité des monoamines qui peuvent être considérées comme des produits de dégradation de la molécule.

On soulignera le fait que, parmi les plus intéressants des curares préparés, se trouvent des substances qui sont précisément des dérivés de la choline, comme l'acétylcholine elle-même. Déjà dans le domaine des poisons du système nerveux parasympathique, BLANKART (22) puis ING (23) avaient montré que l'antagonisme acétylcholine-atropine reposait sur l'existence d'un plan commun dans la molécule, les esters de la choline devenant atropiniques à mesure que s'alourdissait le poids de l'acide salifiant.

Il semble qu'il en soit de même dans le domaine de la transmission neuromusculaire. Les curares de synthèse nouveaux peuvent être représentés comme des éthers lourds et stables dont la molécule comporte plusieurs fois le chaînon de la choline. Dans ces conditions ils manifestent, au niveau de la musculature volontaire, un antagonisme vis-à-vis de l'acétylcholine qui est proportionnel à l'action curarisante du produit.

L'étude des propriétés pharmacodynamiques du 2559 F permet d'observer aussi bien sur la préparation du muscle droit abdominal de grenouille que sur celle du tibial antérieur de chat, cet antagonisme qui avait déjà été signalé pour les différents curares naturels et pour la *d*-tubocurarine.

Nous avons constaté, d'autre part, que l'ésérine exerçait également vis-à-vis du 2559 F l'effet décurarisant caractéristique qu'elle manifeste vis-à-vis des curares bruts et des alcaloïdes purs.

Ces faits semblent constituer une démonstration supplémentaire de l'existence d'un facteur acétylcholinique dans la transmission de l'influx et viennent corroborer sur ce point l'hypothèse qui s'est montrée si féconde de DALE, FELDBERG et VOGT.

On peut trouver dans cette étude des curarisants de synthèse une raison nouvelle pour donner au groupe des substances curarisantes une définition basée sur l'antagonisme compétitif qu'ils manifestent vis-à-vis de l'acétylcholine au niveau des récepteurs de la musculature striée.

Cette manière de voir présente à la fois l'avantage de posséder une valeur explicative et celui de donner des curares une définition qui, étant plus limitée, assure à ce groupe de substances une plus grande homogénéité.

RÉSUMÉ

1) On a reconnu que l'éther phénolique de la choline (iodométhylate de β -diméthylaminoéthoxy-benzène) (I) manifestait sur les mammifères, en dehors des propriétés nicotiques déjà décrites par HUNT et RENSHAW, une action curarisante intense.

2) Il existe entre les propriétés de l'iodoéthylate de β -diéthylaminoéthoxy-benzène (III) et l'éther phénolique de la choline (I) une différence analogue à celle que l'on observe entre l'iodure de tetra-éthylammonium et l'iodure de tetra-méthyl-ammonium; ce dérivé (III) est généralement hypotenseur, et n'accuse d'action curarisante qu'à dose élevée.

3) Comparant à celles de l'éther phénolique de la choline (I), les propriétés du diéther formé à partir de la résorcine (diodométhylate de bis-(β -diméthylaminoéthoxy)-1,3-benzène) II, on constate que l'introduction d'une seconde fonction ammonium quaternaire dans la molécule en diminue fortement les effets hypertenseurs nicotiques.

4) On observe de même que dans le groupe des dérivés de l'iodoéthylate de diéthylaminoéthanol, les diéthers de la pyrocatechine (IV), de la résorcine (V) et de l'hydroquinone (VI), et le triéther du pyrogallol, triiodoéthylate de tri-(β -diéthylaminoéthoxy)-1,2,3-benzène (VII — 2559 F), sont à la fois plus fortement curarisants et moins hypotenseurs que l'iodoéthylate de β -diéthylaminoéthoxy-benzène (III).

5) L'étude des propriétés pharmacodynamiques du 2559 F permet de reconnaître le caractère électif de l'action curarisante qu'il exerce. Aussi bien sur le chien que sur le lapin et le chat, la paralysie de la transmission neuromusculaire ne s'accompagne d'aucun effet secondaire marqué sur la pression artérielle; il supprime l'excitabilité vagale dès 1-2 mg.

L'ésérine s'oppose efficacement à l'action curarisante du produit.

6) Les conclusions qui se dégagent des expériences rapportées sont discutées, en particulier en ce qui concerne la constitution des substances curarisantes, les rapports que l'on peut établir entre la structure des curares de synthèse et la molécule de l'acétylcholine elle-même, ainsi que la définition que l'on doit donner du groupe des poisons curarisants.

BIBLIOGRAPHIE

1. — BOVET, D., COURVOISIER, Y., DUCROT, R. et HORCLOIS, R. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1949, 80, fasc. 2-3.
2. — DRUEY, J. *Thèse Doct. Sc. Paris*, 1936.
3. — STRICKLER, H. *Thèse Doct. Sc., Paris*, 1938.
4. — HUNT, R. et RENSHAW, R. R. *J. Pharmacol.*, 1929, 35, 99; 1929, 37, 193.
5. — HUNT, R. et RENSHAW, R. R. *J. Pharmacol.*, 1933, 48, 105.
6. — DE LESTRANGE, Y. Société de Pharmacie, Paris, Séance du 7 juillet, 1948.
7. — DEPIERRE, F. *C. R. Ac. Sc.*, 1947, 225, 956.
8. — VAN DEN OSTENDE, A. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1948, 75, 419.
9. — WIEN, R. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1948, 77, 96.
10. — BÜLBRING, E. et DEPIERRE, F. *Brit. J. Pharmacol.*, 1949, 4, 22.
11. — HUGUENARD, P. et BOUÉ. Soc. d'Anesthésie, Paris, Séance du 17 juin 1948.
12. — MAZZONI, P., BAISI, F. et LONGO, V. *Archivio di Chirurgia del Torace*, 1948, 2, 325.
13. — KING, H. *J. Chem. Soc.*, 1935, 1381.
14. — BROWN, G. L. *J. Physiol.*, 1938, 92, 23P.
15. — KOPPANYI, T. et VIVINO, A. C. *Science*, 1944, 100, 474.
16. — TILLIE, J. *Arch. exp. Path.*, 1897, 27, 1.
17. — BARLOW, R. B. et ING, H. R. *Nature*, 1948, 161, 718.
18. — PATON, W. D. M. et ZAIMIS, E. J. *Nature*, 1948, 161, 718.
19. — FUSCO, R., PALAZZO, G., CHIAVARELLI, S. et BOVET, D. *Gazz. chim. ital.*, 1948, 78, 511.
BOVET, D., GUARINO, S. et FUSCO, R. *Helv. Physiol. Acta*, 1948, 6, C52.
20. — FUSCO, R., PALAZZO, G., CHIAVARELLI, S. et BOVET, D. *Gazz. chim. italiana*, 1949, 79, 129.
BOVET, D., BOVET-NITTI F., GUARINO, S., LONGO, E. V. et MAROTTA, M. *Rendiconti Ist. sup. Sanità, Roma*, 1949, 12, 106.
21. — CRAIG, L. E. et TARBELL, D. S. *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, 70, 2783.
22. — BLANKART, A. Festschr. Emil Barrell (Hoffmann-La Roche, Bâle) 1936, p. 284.
23. — ING, H. R., DAWES, G. S. et WAJDA, I. *J. Pharmacol.*, 1945, 85, 85.

LABORATORY OF NEUROPHYSIOLOGY, DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY
UNIVERSITY OF MINNESOTA, MINNEAPOLIS, MINNESOTA

CONTRACTURE AND SUPPRESSION ⁽¹⁾

BY

C. F. DICK, J. F. BOSMA AND E. GELLHORN

(Received for publication 8-2-1949).

One of us (J. F. B.) noted in electromyographic studies on a patient, that on stretching of the spastic gastrocnemius the pathological tone in the arm muscles decreased temporarily after a "latent period" of several minutes. The fact that the latent period of this effect was similar to that seen in experiments of DUSSEY DE BARENNE, McCULLOCH (1941) and GAROL (1942) on stimulation of cortical suppressor areas in cat and monkey suggested the possibility that afferent impulses from "spastic muscles" may activate cortical suppressor mechanisms. Subsequent experiments by BARKER and GELLHORN (1947) showed indeed that afferent impulses excite the suppressor areas and that their activation by suitable electrical stimulation is accompanied by a diminution or suppression of the cortical effects induced by afferent somatic and visceral impulses. The present investigation was undertaken in order to determine whether afferent impulses originating in contracted muscles may temporarily suppress cortically induced movements.

METHODS AND MATERIAL

This report is based on 26 experiments performed on 12 cats which were tested in Dial-Urethane narcosis ⁽²⁾. The motor cortex was exposed by the usual technique and stimulated at regular intervals (usually 3 min.) by means of condenser discharges (GOODWIN's apparatus, cf. GELLHORN and THOMPSON, 1944, and MURPHY and GELLHORN, 1945). The electromyogram (EMG) of the contralateral biceps and triceps was

⁽¹⁾ Aided by a grant from the National Foundation for Infantile Paralysis, Inc.

⁽²⁾ Kindly supplied by the Ciba Pharmaceutical Company.

recorded with an OFFNER crystallograph by means of fine copper wires which, insulated except for several mm., were sewn into the muscles. A contracture of the gastrocnemius was induced either by tenotomy or through indirect stimulation. The tenotomy was performed aseptically 1 to 4 days prior to the experiment. The tenotomized muscle was stretched by means of a lever with 250 to 2000 grams applied for 1 to 10 minutes. In 5 cats a contracture of the gastrocnemius was induced in the anesthetized animal by stimulation of the sciatic nerve with condenser discharges of 1 to 2 volts at a frequency of 40 to 90 per second for 2 to 8 seconds at intervals of 2 minutes for 1 to 2 hours. Afferent impulses from such contracted muscles were elicited by slight manual dorsiflexion of the ankle for 10 seconds. Neither of the factors mentioned seems to be solely responsible for the contracture. However these procedures were effective in cats which had been anesthetized and suspended in air for 30 hours and more. The recording of the E. C. G. in cats and monkeys was done as described in previous papers.

RESULTS

The alterations in the EMG of the right triceps (induced by electrical stimulation of the motor cortex) following the stretching of the right gastrocnemius muscle are illustrated in Figure 1. In this experiment the contracture was produced by sciatic stimulation. Although in the

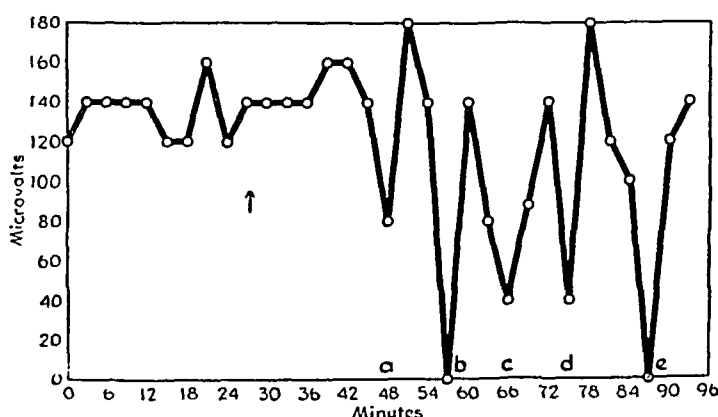


FIG. 1

Cat, Dial-urethane narcosis.

Contracture in right gastrocnemius induced by sciatic stimulation (2.5 volts, freq. 90, duration 5 sec. at intervals of 5 min. for 70 min). Cortical stimulation with 6.3 V, 21/sec. for 10 seconds at intervals of 3 min. Ordinate: maximal amplitude of E.M.G. of triceps in microvolts; Abscissa: time in min. At the arrow the gastrocnemius is stretched maximally for 10 seconds.

original experiment the EMG of biceps and triceps was recorded, the figure of the biceps was omitted in order to save space. The maximal height of the EMG expressed in microvolts is indicated during the control period and after the application of a light manual stretch applied for 10 seconds to the contractured gastrocnemius muscle. It is seen that the EMG shows only slight variation during the control period

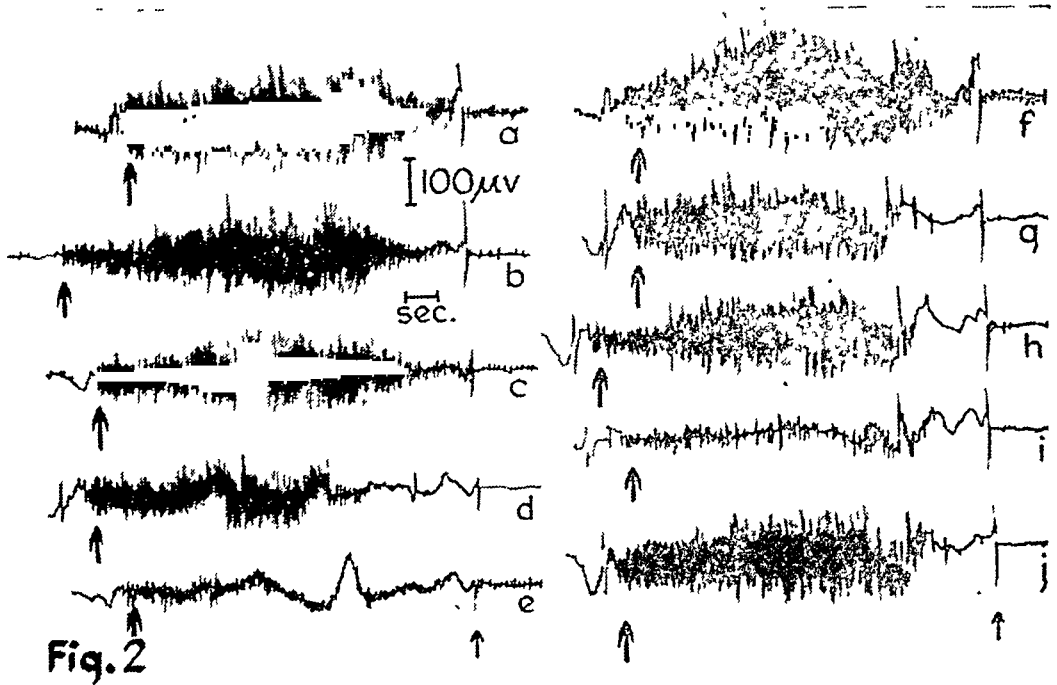


FIG. 2

Effect of light manual stretch of contractured gastrocnemius (induced by electrical stimuli). Electrical stimulation (between the arrows) of the contralateral motor cortex (3 volts, frequency 90/sec., at intervals of 3 minutes for 10 seconds). E.M.G. of the biceps; *d, e, f, g, h, i, j, l, 4, 13, 25, 28, 31, 34 min.* respectively after stretch. Note suppression at *e* and *i*. Read from right to left.

and for 18 minutes following the stretch of the gastrocnemius. Hereafter, periods of suppression occur which greatly reduce or even abolish the response of the muscle to cortical stimulation. The records of the biceps show a very similar, although not strictly parallel, reaction. However, all phases of suppression noted in the triceps records were likewise present in the EMG's of the biceps. The suppression elicited by muscle stretch is indicated not only by the reduction in the magnitude in the visible motor response and the height of the EMG, but also by the length of the summation time⁽¹⁾. The latter averaged 5 seconds

(¹) Cf. COOPER and DENNY-BROWN (1927).

during the control period, but rose to 6.4'' ∞ , 8'', 8.2'', and ∞ at the suppression periods *a*, *b*, *c*, *d* and *e* respectively (FIGURE 1). Similar changes were noted for the summation time of the biceps.

Figure 2 demonstrates the effect of stretching a contracted gastrocnemius on the EMG of the biceps. The records *a*, *b*, *c* are selected from a large series of control records preceding the stretching of the gastrocnemius in order to show the relatively slight changes in EMG response observed under control conditions. Records *d* and *e*, taken 1 and 4 minutes respectively after stretch show a slow development of suppression in the progressive diminution of the height of the EMG's and the increase in length of the summation time. The suppression was maximal seven minutes after stretch and then receded gradually. Thirteen minutes post stretch (1) the EMG was normal or slightly larger (1). This record was followed by a series of observations showing that the EMG response showed only slight fluctuations for the next 15 minutes. Then another brief but intensive suppression followed (i) from which the animal recovered completely (j).

As was mentioned earlier, the tenotomized muscle was loaded for periods from 1 to 10 minutes. In these experiments it was frequently observed that in addition to one or more periods of suppression which followed the stretching of the gastrocnemius alterations in the response of biceps and triceps to cortical stimulation occurred also during stretching. In several instances the EMG response was unaltered during the first minute of stretch but declined later, e.g. during the 4th minute of stretch. However, the EMG response was restored to control values on cessation of the stretch. Hereafter, (i.e. after an interval of several minutes) 1 or more periods of suppression occurred. In other experiments an increased EMG response was noted temporarily during the stretching of the gastrocnemius. This is well demonstrated in figure 3 (2) which shows in the triceps record (*b*) during stretching not only an increased height of the EMG but also an increased after-discharge. The increased responsiveness of the biceps is likewise distinct (*b'*). This experiment shows, in addition, two periods of suppression at 10 and 25 minutes after stretch (*d*, *d'* and *f*, *f'* respectively). The fact that in this experiment the triceps showed tonus, allows one to link up these observations with recent studies of BOSMA and GELLHORN (1946) who showed, in experiments on the motor cortex, that at moderate

(1) Slight increases in the EMG response above the control were observed several times immediately following a suppression (cf. also the height of the EMG following the periods *a* and *d* in figure 1).

(2) The individual potentials in the biceps record are due to the E.K.G.

intensities of stimulation an inhibitory stage commonly preceded the period of excitation. This phenomenon is seen in all triceps records of figure 3. During marked suppression (*d* and *f*) a period of inhibition not only precedes, but also follows the period of excitation (¹). Similar phenomena were noted in the experiments of BOSMA and GELLHORN without the intervention of suppressor action if very weak stimuli were applied to the cortex. It seems to follow that the suppression

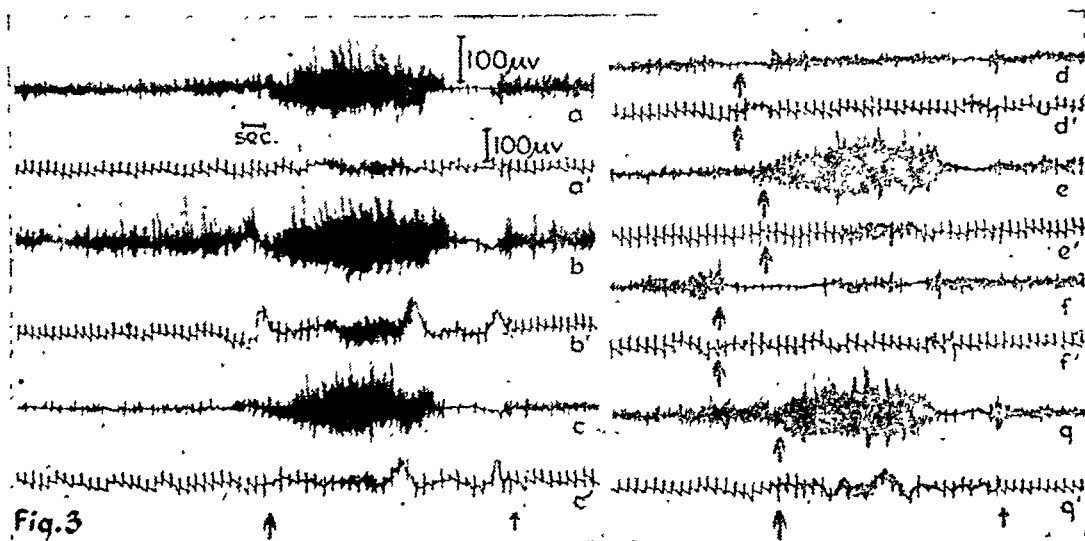


FIG. 3

Effect of stretching the tenotomized gastrocnemius for 3 min. with 2000 gms. on the E.M.G. of the Triceps (*a* to *g*) and Biceps (*a'* to *g'*) induced by electrical stimulation (between the arrows) of the contralateral motor cortex (8 volts, frequency 43/sec., at intervals of 3 minutes for 10 seconds). Read from right to left, *a* and *a'*, controls; *b* and *b'*, during stretch of gastrocnemius (one minute after loading); *cc'*, *dd'*, *ee'*, *ff'*, *gg'*, 7, 10, 16, 25 and 34 min. respectively after stretch. Note suppression at *dd'* and *ff'*.

resulting from the stretching of the gastrocnemius leads only to quantitative, but not to qualitative changes and that with a decreasing number of discharging neurons inhibitory phenomena become increasingly predominant.

It was suggested in BOSMA and GELLHORN's study that as the number of discharging neurons increases with increasing intensity or duration of the stimulus (facilitation) reciprocal innervation tends to change into simultaneous innervation of agonist and antagonist (co-innervation). If, as in the experiments of figure 3, a stimulus is employed which causes, under control conditions, simultaneous activity of triceps and

(¹) The second period of inhibition may be followed at the end of the stimulation by a distinct rebound (*f*).

biceps, and if suppression reduces the number of discharging neurons evidence for reciprocal innervation should appear. This is indicated in record *d* and *d*¹ in which at the onset and at the end of the period of stimulation inhibition of the triceps is associated with a slight activity of the biceps whereas during the remainder of the period of stimulation activity of the triceps is associated with inhibition of the biceps.

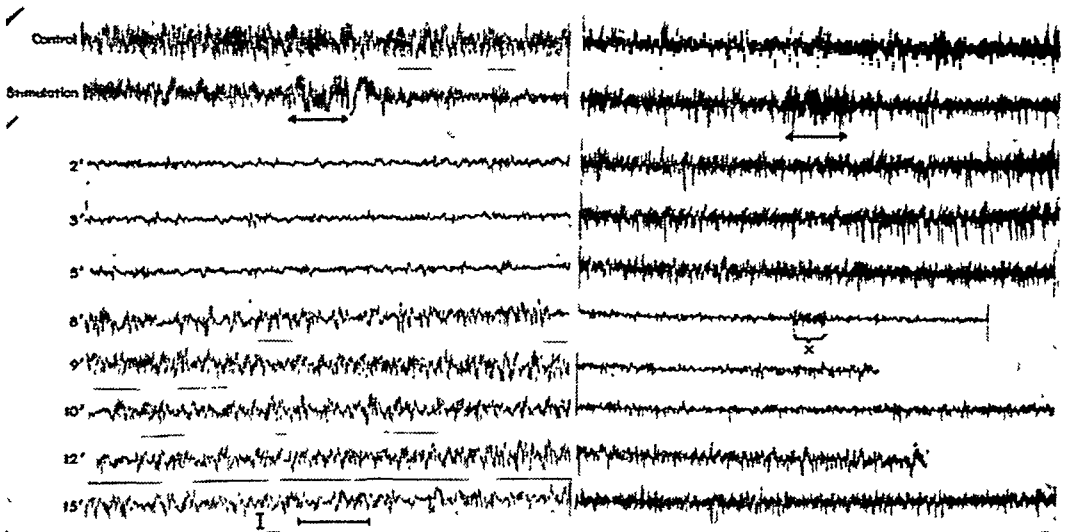


FIG. 4

Effect of sciatic stimulation (Harvard inductorium, 1.5 V at 13 cm and 45°, indicated by horizontal arrow) on the ECG of the cat. Third day after Dial injection. Calibration: 5 seconds and 100 microvolts. The left and right groups of records were obtained from a lateral and medial site of the contralateral sensori-motor cortex respectively. Note suppression in both areas. Disregard part of record marked *x*.

There are still other observations which support our interpretation that suppression induced by afferent impulses involves reduction of the discharging neurons. It was noted by MURPHY and GELLHORN (1945) that stimulation of the cortex of cat and monkey with very low intensities may elicit a certain movement (e.g. the flexion of the knee) only after the cessation of the stimulus, i.e. in the form of an after-discharge whereas with a slightly greater stimulation the flexion appears during the period of stimulation. Similarly, it was found in the present study that under the influence of a reflexly induced suppression the muscle activity may be absent during stimulation but may appear in the form of an afterdischarge.

Thus the reduction of muscular response as the result of a diminution in the intensity of electrical cortical stimulation, and the diminution

of muscle action as a consequence of reflexly induced suppression lead to similar phenomena and suggest that the cortical mechanism involved in both cases is similar.

In further experiments an attempt was made to correlate changes in the E.C.G. recorded from the sensori-motor and suppressor areas with muscle stretch. Suppression of cortical electrograms was not observed

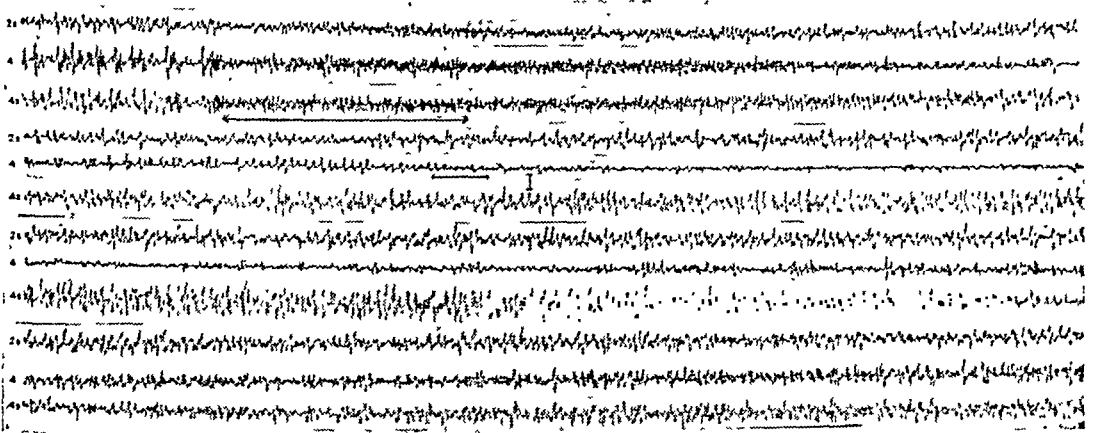


FIG. 5

Effect of slight pull on contralateral sciatic (horizontal arrow) on ECG (Monkey). Note that excitation of area 4 and 4s is followed by suppression in area 4 only. This is a continuous record. Calibration: 300 microvolts and 5 seconds.

but in all seven cats which were studied in this series a marked increase in the dial potentials occurred, either following immediately or several minutes after the period of stretch. In several other experiments very mild stimuli were applied to the sciatic nerve (faradic stimuli, Harvard inductorium, 1.5 V, secondary coil at 13 cm and an angle of 45° , or slight mechanical stimulation of the nerve). In some of these experiments definite evidence of a cortical suppression was obtained. Since this effect on the corticogram appeared at slightly different times in different cortical areas it cannot be due to circulatory changes (FIGURE 4). A characteristic effect on the cortex of the monkey is shown in figure 5. Sciatic stimulation elicited at first an excitatory effect (potentials became smaller and more frequent) particularly in the motor cortex (area 4) and in the suppressor area. This was followed by a suppression in area 4 which lasts for more than one minute. During this time the potentials decreased in amplitude and frequency. Their appearance is similar to that described by DUSSER DE BARENNE and McCULLOCH and more recently by BARKER and GELLHORN after electrical stimulation of the suppressor areas.

DISCUSSION

The experiments reported in this paper show that afferent impulses set up in the muscles of the hind leg in which a state of contracture is induced either by tenotomy or by repeated indirect stimulation of the muscle (fatigue contracture) lead to a delayed and often repetitive suppression of the cortically induced activity of the foreleg muscles. That the cortex, and particularly the cortical suppressor areas are involved, is suggested by the following data :

1) Latent period and repetitive character of the suppression observed in our experiments are similar to that seen by DUSSER DE BARENNE and McCULLOCH (1941) and GAROL (1942), and ourselves when the suppressor areas were stimulated directly, either by mechanical or electrical stimuli ⁽¹⁾ or by eserine + acetylcholine (BECKETT and GELLHORN). Indeed, in four experiments the suppression induced by muscle stretch could be duplicated by electrical stimulation of a cortical suppressor area.

2) The detailed study of the EMG's following cortical stimulation of the motor area under the influence of stimuli of varying intensities and duration (BOSMA and GELLHORN) and the present study on the influence of afferent impulses originating in contracted muscles show striking similarities. The suppression resembles in every detail the change which may be caused by reduction in intensity or duration of cortical stimulation.

3) Stretch of a contracted muscle causes regularly an excitation of the contralateral cortex including its suppressor areas (GELLHORN 1947). Moreover, in recent experiments (GAY and GELLHORN, 1948) evidence was presented that proprioceptive impulses resulting from stimulation of the peripheral end of S_1 induce an excitation of the sensori-motor cortex and the suppressor areas in the monkey.

4) Mild stimulation of a peripheral nerve (sciatic) may induce temporary suppression of cortical potentials.

5) Muscle stretch induced an accentuation of Dial potentials which appeared with higher amplitude and shorter intervals. Similar effects were produced by electrical stimulation of cortical suppressor areas when we did not succeed in inducing cortical suppression ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Stimulation of the suppressor area in man causes a suppression of the effect of electrical stimulation of the motor cortex after a few seconds (GAROL and BUCY (1944).

⁽²⁾ Fulton (personal communication) emphasizes the importance of proper frequency of stimulation of the suppressor areas in order to avoid excitatory effects and recommends pulses of 10 msec duration at 40 per second since in his experience higher rates and shorter pulses are more likely to produce facilitation than suppression.

The peculiar difficulty of producing cortical suppression through afferent stimuli is easily understandable in view of the fact that afferent stimuli although activating the suppressor areas (GELLHORN, 1947) induce an excitation of motor and sensory cortical projection areas. The observation that very mild excitation of the sciatic was the only form of afferent stimulation which induced suppression of the E.C.G. is probably related to the fact that the low threshold proprioceptive fibers cause a rather restricted cortical excitation ⁽¹⁾ (sensori-motor and suppressor areas) in contrast to the widespread cortical excitation resulting from the nociceptive stimuli. Both types of impulses activate suppressor areas (GELLHORN, 1947) but the balance is commonly shifted toward the excitatory side and only by mild peripheral stimuli and proper central responsiveness (degree of anesthesia) can cortically induced suppression be accomplished.

SUMMARY

Stretch of contracted muscles elicits delayed and often repetitive suppression of the responsiveness of the motor cortex as indicated by the amplitude of the E.M.G. resulting from stimulation of the motor cortex with a standardized electrical stimulus. As in the experiments on electrical stimulation of cortical suppressor areas the suppressor effect starts usually after a latent period of 4 to 10 minutes. It lasts for 3 to 6 minutes and frequently appears again for a similar period.

During the course of the suppression the summation time is greatly lengthened and co-innervation (simultaneous contraction of agonist and antagonist) is replaced by contraction of the agonist alone. Moreover, the period of innervation may be preceded and followed by inhibition. These changes likewise resulting from the diminution of the intensity or of the duration of the cortical stimulation were interpreted as due to the activation of a lesser number of cortical neurons (BOSMA and GELLHORN, 1946). It is therefore suggested that afferent impulses originating in contracted muscles under stretch activate cortical suppressor areas and thereby reduce the number of neurons of the motor area which respond to the standard stimulus.

Stretch of contracted muscles did not induce suppression of the E.C.G. but intensified the dial potentials. This change suggests diminished cortical excitability. Moreover, mild stimulation of afferent nerves results in typical suppression of the E.C.G.

⁽¹⁾ Unpublished observations.

The experiments seem to indicate that afferent impulses may lead to activation of suppressor areas which results in temporary suppression of cortical potentials and a diminished responsiveness of the motor cortex.

REFERENCES

1. — BARKER, S. H. and GELLHORN, E. Influence of suppressor areas on afferent impulses. *J. Neurophysiol.*, 1947, 10, 133-138.
2. — BECKETT, S. and GELLHORN, E. Role of acetylcholine in the activity of sensorimotor and suppressor areas of the cortex. *Am. J. Physiol.*, 1948, 153, 113-120.
3. — BOSMA, J. F. and GELLHORN, E. Electromyographic studies of muscular coordination on stimulation of motor cortex. *J. Neurophysiol.*, 1946, 9, 263-274.
4. — COOPER, S. and DENNY-BROWN, D. E. Responses to stimulation of the motor area of the cerebral cortex. *Proc. Roy. Soc. B. London*, 1927, 102, 222-236.
5. — DUSSER DE BARENNE, J. G. and MCCULLOCH, W. S. Suppression of motor response obtained from area 4 by stimulation of area 4s. *J. Neurophysiol.*, 1941, 4, 311-323.
6. — GAROL, H. W. The motor cortex of the cat. *J. Neuropathol. and Exp. Neurol.*, 1942, 1, 139-145.
7. — GAROL, H. W. and BUCY, P. C. Suppression of motor response in man. *Arch. Neurol. and Psychiat.*, 1944, 51, 528.
8. — GAY, J. R. and GELLHORN, E. Presented at the meeting of the American Physiol. Society, Minneapolis, September 1948.
9. — GELLHORN, E. Effect of afferent impulses on cortical suppressor areas. *J. Neurophysiol.*, 1947, 10, 125-132.
10. — GELLHORN, E. and THOMPSON, L. The influence of muscle pain of cortically induced movements. *Am. J. Physiol.*, 1944, 142, 231-239.
11. — MURPHY, J. P. and GELLHORN, E. Multiplicity of representation versus punctate localization in the motor cortex. *Arch. Neurol. and Psychiat.*, 1945, 54, 256-273.

LABORATORIO DE BIOFÍSICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
DE BUENOS AIRES. REP. ARGENTINA

THE MECHANISM OF ARTERIAL HYPERTENSION AFTER POTASSIUM INJECTIONS INTO THE NERVE CENTERS

BY

V. H. CICARDO

(Received for publication 15-2-1949).

STERN and CHVOLES (1933) found that intraventricular injections of isotonic potassium chloride solutions produce an intense nervous excitation and increase of the arterial pressure. According to STERN (1942) the arterial hypertension after intracisternal injections of potassium phosphate would be due to the direct action of the ionic potassium upon the sympathetic nerve centers, while the phosphate, by reducing the concentration of ionized Ca, would cause a depression of the parasympathetic centers. The excitation of the vasoconstrictor centers of the fourth ventricle by intracisternal injections of potassium has also been reported by VLEESCHHOUWER (1935), and by HERMANN, JOURDAN, MORIN and VIAL (1938). They also admit the excitation of the adrenalin secretory centers of the bulb, since adrenal-yugular anastomosis resulted in adrenal hypertension in the receiver dog with spinal cord section after intracisternal injection of potassium chloride in the donor dog.

VON EULER (1938) reported that the injection of KCl into the internal carotid artery or vertebral artery decreased the blood pressure and caused bradycardia and a transient inhibition of respiration, while the intracisternal injection produced a marked rise in blood pressure, which was neutralized by ergotoxine. These different effects on pressure would depend on whether the potassium is injected into the carotid artery or into the cistern. Hypertension and increase of respiratory rate after intracisternal injections of potassium phosphate have also been reported by SMOLIK (1944), and by SHEPPARD, SMOLIK and GILSON

(1945), who found that the injection of small doses of this salt produced an opposite effect, viz. decrease of pressure and bradycardia, which would be due to the excitation of the vagal centers. During the perfusion of the cerebral ventricles with solutions in which potassium concentration was increased or calcium eliminated, LEUSEN (1948) observed hypertension and reflex hyperexcitability of the vasomotors.

The purpose of this study was to test the validity of the above mentioned conclusions, and in the course of the experiments it became evident that in addition to the mechanisms described, there was still another causative factor of hypertension induced by potassium injections into the nerve centers.

In fact, in the dogs whose sympathetic had been blocked by large doses of ergotamine, as well as in bivagotomized, biadrenalectomized, and in those with spinal cord section, the hypertension, though of less intensity, appeared after the intracisternal injection of potassium chloride.

METHODS

The experiments were carried out under nembutal (sodium ethyl barbiturate) anesthesia in about 80 dogs. The arterial pressure was recorded at the level of the femoral artery, and respiration from a pneumograph and Marey's tambour. From 0.1 to 0.5 c.c. of a 3 p. cent potassium chloride solution were injected into the diencephalic centers and intracisternally.

The diencephalic injections were carried out into the lateral ventricles or into the mass of the thalamus or hypothalamus, for which purpose trephine openings, sufficiently wide to allow the introduction of the needle, had been made in the parietal. The control of the injections was done by introducing through the same needle a solution of methylen blue, which procedure permitted to establish the exact site of the potassium injection.

Most of the experiments were carried out with intracisternal injections after suboccipital puncture in animals under different experimental conditions, viz. 1) animals in which the sympathetic nerve centers had been blocked by the intravenous injection of 1 mg of ergotamine; 2) dogs in which the spinal cord had been destroyed between the D6 and C6 by introducing a needle, the phrenic nerve centers having been spared in order to maintain natural respiration; 3) animals in which both adrenal glands had been acutely removed by the abdominal way; 4) animals in which both vagi had been transected at the level of the

neck; 5) dogs in which acute hypophysectomy had been performed by the lateral way, and 6) animals in which these different operations had been combined in order to detect the factors that are intervening in the production of the hypertension after intracisternal injections of the ionic potassium.

RESULTS

a) Intradiencephalic injections.

The injections of 0.5 c.c. of potassium chloride solution into the lateral ventricles produce a marked increase of arterial pressure and tachycardia; simultaneously there is also an increase of respiratory amplitude and frequency (FIG. 1, 2). It must be pointed out that these large increases could never be obtained by the electrical stimulation of the same areas as had been injected with potassium; this means that this ionic element constitutes a far more efficient blood pressure and respiratory stimulant than the electrical currents.

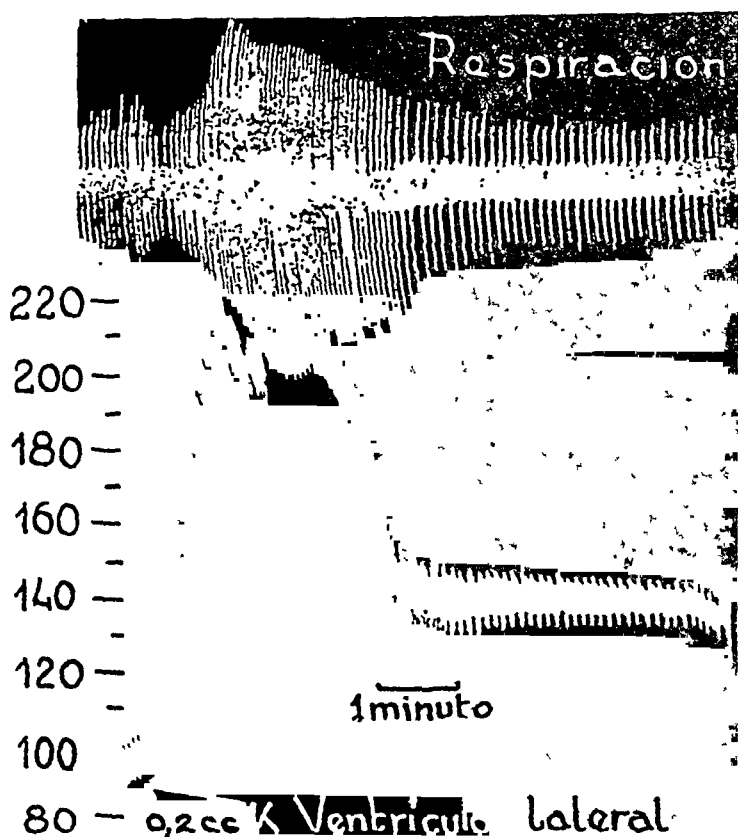


FIG. 1

Respiratory and arterial pressure changes after potassium injections into the lateral ventricles of the brain.

Potassium injections outside the described diencephalic centers did not produce any effect, and even some areas of the thalamus remained responseless. It may be assumed that the diffusion of the injected potassium produces the excitation of centers distant from the injected area.

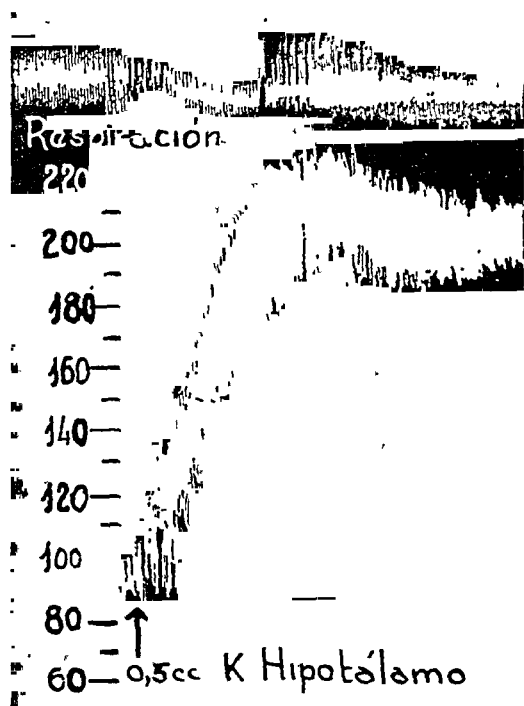


FIG. 2

Respiratory and arterial pressure changes after potassium injections into the hypothalamus.

b) Intracisternal injections of potassium.

Intracisternal injections of 3 p. cent potassium chloride solutions produce arterial hypertension in doses of 0.1 c.c. to 0.3 c.c., which means that smaller quantities than those needed to elicit similar effects in the diencephalon are required (FIG. 3). This hypertension lasted about 10 minutes, after which the initial or a somewhat higher pressure value was again reached. When the injections are repeated, the centers "become accustomed" and larger doses are needed to obtain the pressure effect. The repetition of the potassium doses stops breathing, and death from asphyxia occurs, which can be prevented by artificial respiration. With repeated injections of the potassium solution, even in doses as large as 1 c.c., no pressure response at all occurs; on the contrary, the arterial pressure is gradually decreasing, which can be

attributed to potassium induced intoxication of the arterial pressure regulating centers. As is shown in the tracings, there occurs a marked stimulation of the respiratory activity, with increase in rate and amplitude. Larger doses of potassium cause the cessation of breathing and death from asphyxia.

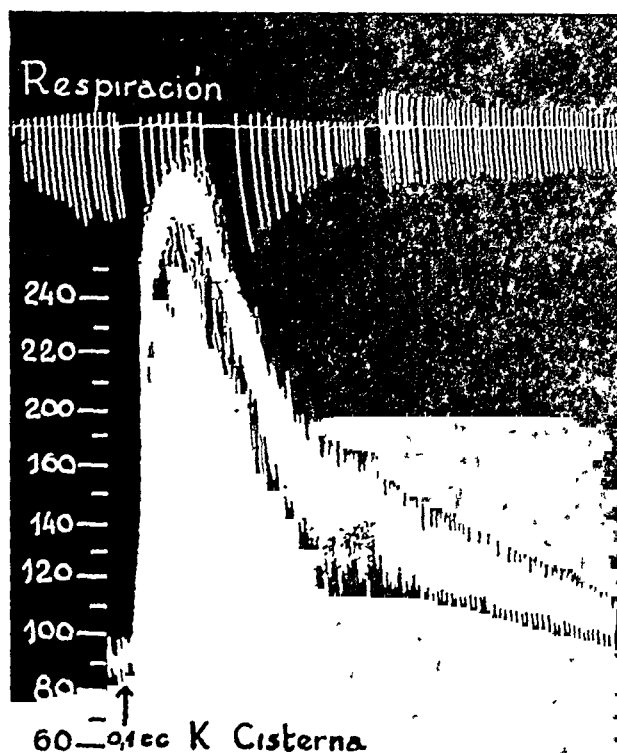


FIG. 3

Respiratory and arterial pressure changes after intracisternal injections of potassium.

Investigations were carried out to detect the factors intervening in the mechanism of this hypertension. Starting from the hypothetical standpoint that it might well be produced by the excitation of the vasoconstrictor and adrenal centers of the bulb, and by the liberation of the vasopressor hormone of the hypophysis, the intracisternal injections of potassium were administered under different experimental conditions.

The blocking of the sympathetic by 1 mg of ergotamine, though diminishing it, did not prevent hypertension induced by intracisternal potassium injections (FIG. 4).

Considering the possibility that the blocking of the sympathetic had not been complete, the sympathetic centers of the spinal cord were eliminated by cord destruction between the 6th D and the 6th C, and by bilateral vagotomy at the level of the neck; it was found that in spite



FIG. 4

After intravenous injection of 1 mg of ergotamine in the dog, the animal responds with less intensity to the injection of 3 p. cent KCl.

of the surgical blocking of the sympathetic paths, hypertension occurred in the same manner as in the ergotaminized animals (FIG. 5).

The intracisternal injection of potassium causes excitation of the adrenals over the splanchnic nerves, and liberation of adrenaline, which makes it understandable why adrenalectomy results in a marked decrease of the pressure effect.

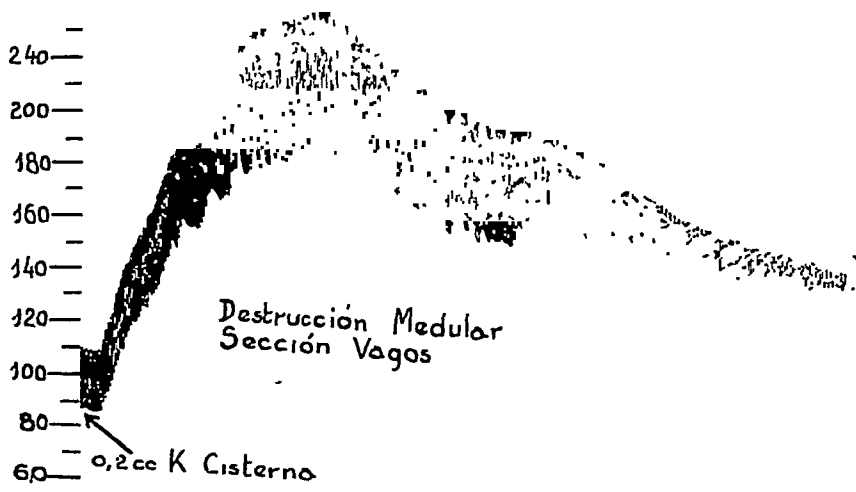


FIG. 5

Spinal cord destruction between the 6th C and 6th D, and vagotomy do not prevent the hypertension following intracisternal injection of potassium.

When the above sympathetic-adrenal mechanism is eliminated by spinal cord destruction, vagotomy, and removal of the adrenals, the increase of the blood pressure after intracisternal injection of potassium still persists, though less markedly than in the intact animals (FIG. 6).

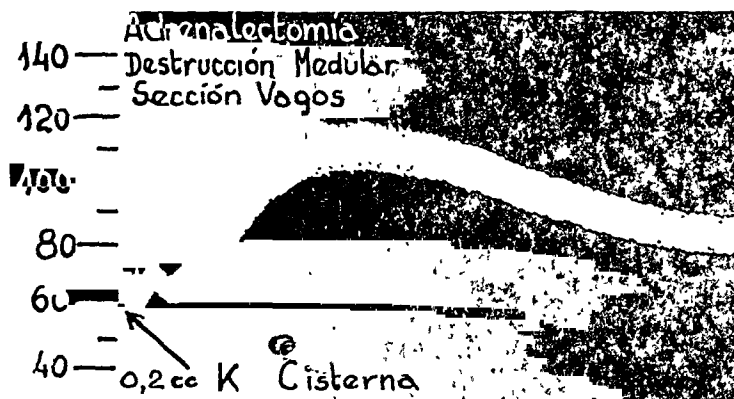


FIG. 6

Adrenalectomy in dogs with spinal cord section and vagotomy does not prevent hypertension.

The hypertension does not appear when the animals under these experimental conditions are hypophysectomized (FIG. 7).

Spinal cord destruction and vagotomy in dogs, when performed after acute hypophysectomy and adrenalectomy, prevent blood pressure from increasing. The hypertension is also prevented by sympathetic-adrenal blockage after large doses of ergotamine in hypophysectomized animals (FIG. 8).

Intracisternal injections of potassium in hypophysectomized animals produce a noticeable hypertension (FIG. 9).

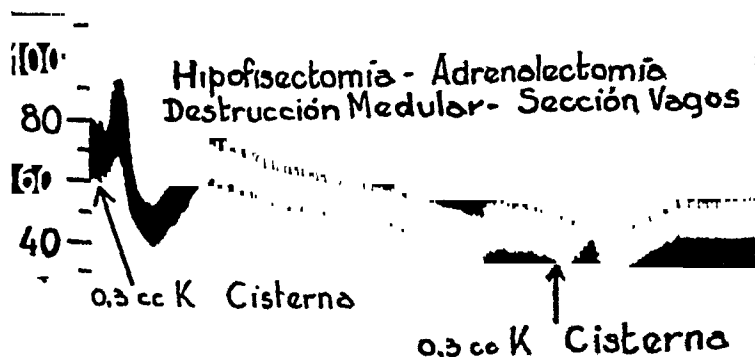


FIG. 7

Hypophysectomy after elimination of the sympathetic-adrenal mechanism prevents hypertension.

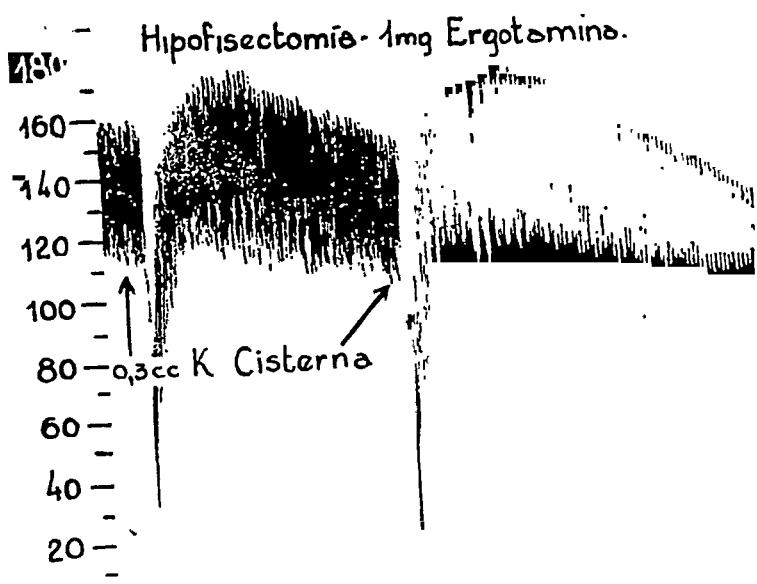


FIG. 8

Hypophysectomy in dogs with ergotamine blocked sympathetic centers prevents hypertension.

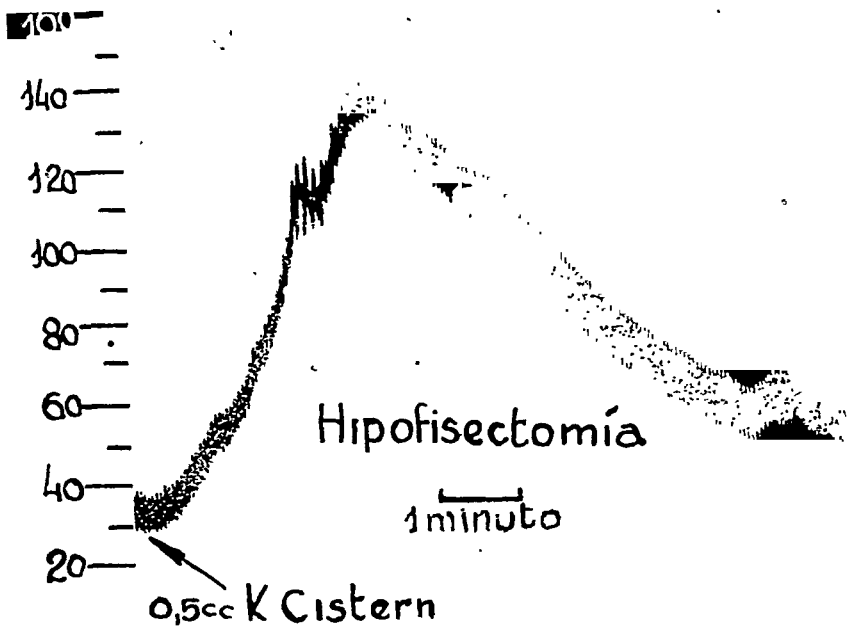


FIG. 9

Hypophysectomy by itself does not prevent hypertension.

The sympathetic nerve endings by themselves are capable to increase blood pressure, as was observed in acutely adrenalectomized and hypophysectomized dogs (FIG. 10).

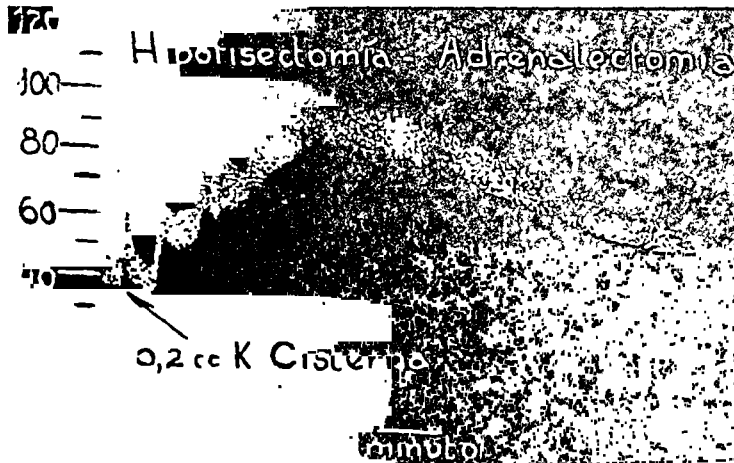


FIG. 10

Hypophysectomy and adrenalectomy decrease the intensity of hypertension.

DISCUSSION

In addition to the excitation of the vasoconstrictor and adrenal centers, reported by HERMANN and coll. (1938) as the causative factor of the mechanism of hypertension subsequent to intracisternal injections of potassium salts, the hypophysis plays also an important role.

We have found that in adrenalectomized dogs in which the sympathetic paths had been destroyed, and also in those with sympathetic-adrenal blockage by ergotamine, the response to intracisternal injections of potassium chloride was an increase of blood pressure, though less marked than in intact animals. These increases in pressure do not occur when the animals are hypophysectomized after the elimination of the sympathetic-adrenal centers.

CLARK & WANG (1939), and SATTLER (1940) reported that the electrical stimulation of the supraoptical region of the hypothalamus produces a pressure effect due to the humoral activation of the neurohypophysis via the supraoptical-hypophyseal tract. It has also been suggested that the diffusion of the ionic potassium from the cistern activates the supraoptical nuclei and the neurohypophysis, for which reason hypophysectomy would suppress the pressure effect in animals with sympathetic-adrenal blockage.

SUMMARY

1) The sympathetic nervous system, the adrenals, and the hypophysis must be considered as causative factors of the hypertension which follows intracisternal or diencephalic injections of potassium chloride in dogs.

2) The destruction of the spinal cord and of the vagi in acutely adrenalectomized and hypophysectomized dogs prevents the increase in arterial pressure.

3) Hypertension is also prevented by blockage of the sympathetic-adrenal centers with ergotamine in hypophysectomized animals.

4) The persistency of one of the three factors, viz. sympathetic centers, adrenals or hypophysis, permits the obtention of the increase in pressure, though with less intensity than in intact animals.

5) As repeated intracisternal injections of potassium diminish gradually the sensibility of the centers, increasing doses are required to provoke hypertension, which in turn is followed by an arterial pressure fall.

6) Large doses of potassium stop breathing, which makes artificial respiration necessary in order to prevent death.

7) Potassium is a much more efficient stimulant to elicit diencephalic hypertension than are the electrical currents.

REFERENCES

1. — CLARK, G., WANG, S. C. *Am. J. Physiol.*, 1939, 127, 597.
2. — EULER, U. S. VON. *Skand. Arch. Physiol.*, 1938, 80, 94.
3. — HERMANN, H., JOURDAN, F., MORIN, G., VIAL, J. *C. R. Soc. de Biol. Paris*, 1938, 129, 593.
4. — LEUSEN, I. *Arch. intern. Pharmacodynamie*, 1948, 77, 48.
5. — SATTTLER, D. G. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, (New York), 1940, 44, 82.
6. — SHEPPARD, M. W., SMOLIK, E. A., GILSON, A. S. *Am. J. Physiol.*, 1945, 145, 223.
7. — SMOLIK, E. A. *Surgery*, 1944, 15, 460.
8. — STERN, L., CHVOLES, G. J. *C. R. Soc. de Biol. Paris*, 1933, 112, 568.
9. — STERN, L. *Lancet*, 1942, 2, 572.
10. — VLEESCHHOUWER, G. *Arch. intern. Pharmacodynamie*, 1935, 50, 251.

ISTITUTO DI FARMACOLOGIA DELL'UNIVERSITÀ DI PALERMO

CORRELAZIONI FRA INTERRENALE E CROMAFFINE**Nota I. Azione associata contemporanea dell'adrenalina
e dell'endocorticalina sul cuore isolato di rana ⁽¹⁾***(With Summary)*

DI

A. RABBENO

(Manoscritto ricevuto il 2-3-1949).

PREMESSA

Nei cani surrenoprivi, mentre si dimostrano chimicamente nel sangue corpi adrenalinosimili, in quantità pressochè uguale a quella dei cani normali (VIALE, 1931), le risposte funzionali all'adrenalina (adr.) mancano o sono invertite e VIALE ne aveva tratta l'ipotesi che la corticale fra le sue funzioni avesse quella di attivare l'adr.

Riprendendo, nel 1946, il mio lavoro di laboratorio, pensai di sottoporre questa ipotesi all'indagine sperimentale. La ricerca bibliografica condotta in parallelo con gli esperimenti, si estese assai più del previsto, e mi condusse a raccogliere gran numero di fatti, di osservazioni, di concezioni di ordine anatomico, biochimico, fisiopatologico, farmacologico e clinico che parlano di stretti rapporti, di intime correlazioni fra tessuto cromaffine e tessuto interrenale, fra adr. e increti cortico-surrenali. Il gruppo degli « attivatori » dell'adrenalina, comprende un grande numero di sostanze, maggiore di quanto forse comunemente si pensi. Il vasto materiale bibliografico sui rapporti fra corticale e midollare sarà riunito in una dettagliata rassegna (29) corredata di ampia bibliografia ed in un articolo riassuntivo (30) ai quali rimando, limitandomi qui a ricordare i pochi lavori che in qualche modo si riannodano all'azione associata dell'adrenalina con la cortina e i corticormoni, riguardo all'apparato circolatorio.

L'ipotesi che lipidi corticali attivino l'azione dell'adr. secreta dal cromaffine, che esaltino l'effetto del neurormone [simpatina secondo

⁽¹⁾ Queste ricerche sono state eseguite nell'istituto di Farmacologia dell'Università di Torino, diretto dal Prof. CHÌÒ, al quale rinnovo il mio vivo grazie per l'amichevole ospitalità.

CANNON; noradrenalina secondo le più recenti ricerche di EULER (4)] che si libera nei visceri per stimolazione delle fibre postganglionari adrenergiche, ha suscitato molte ricerche per spiegare la patogenesi dell'ipertensione essenziale, in cui di regola l'adrenalinemia non è aumentata.

Rinforzo dell'effetto adrenalinico su arterie isolate, è stato osservato per effetto del colesterolo da WESTPHAL e HERMANN (1935) da DRESEL e STERNHEIMER (1928), per azione di estratti lipoidei da KONSHEGG (1932). Con miscele di adrenalina e lipoidi, KONSHEGG e MONAUNI (1937), ottennero in vitro associazioni più attive sulle arterie, sul cuore isolato della sola adr. contenutavi e dimostrarono la presenza in vivo di questi complessi estraibili a caldo con alcool dal sangue e dagli organi, dai quali complessi l'adr. è liberabile con acidi.

Il meccanismo di blocco e di rimescolamento degli apparati muscolari delle vene surrenali, faciliterebbe nel sangue surrenale la formazione in vivo di questi complessi. WESTPHAL e SIEVERT (1938) in base a ricerche istologiche e biochimiche in surreni ipertrofici di conigli, ammisero pure l'esistenza di complessi adrenalino-lipoidei che però supposero consistere non in composti chimici veri e propri come aveva pensato KONSHEGG, ma in prodotti di adsorbimento, di adrenalina « legata » ai lipoidi in forma labile. L'unione nei surreni dell'adrenalina con lipidi (lecitine, steroidi corticali), con l'acido ascorbico potrebbe avvenire in quegli spazi canalicolari ghiandoliformi, sulla cui esistenza nella corticale e nella midollare, non è stato ancora raggiunto pieno accordo dagli istologi. Le più antiche descrizioni eseguite da MANASSE (1894) da altri osservatori, di lumi, di spazi nei cordoni cellulari dell'interrenale e del cromaffine, erano state ritenute immagini illusorie da fissazioni non idonee e da fatti patologici. Le indagini di KOLMER (1912; 1918) le più recenti di LUCADOU (1938) e di WESTPHAL e SIEVERT (1938) parlano per la presenza, soprattutto evidente nei surreni ipertrofici, di cavità ripiene di ammassi lipidici, colorabili col Sudan e procedenti dalla zona glomerulare attraverso la fascicolata e la reticolare, nella midollare. I rapporti di questi lumi ghiandoliformi coi vasi sanguigni non sono stati però chiariti.

ASHER e RAUSCHER (1932) hanno osservato che un estratto corticale tipo cortina, potenzia l'effetto dell'adr. sul lavoro del cuore registrato col metodo ottico di O. FRANK. SANDERS (1938) constatò che gli estratti di surreni dimostrano sugli organi isolati un'azione 2-3 volte più elevata di quella corrispondente al loro contenuto in adr.; attivazione che l'autore riferisce a maggiore stabilità dell'adr. per ritardata sua ossidazione da parte di sostanze presenti negli estratti corticali. SHÜRGER (1947)

invece non avrebbe confermato questi risultati col Percortèn idrosolubile (glucoside del desossicorticosterone). In giovani sani dopo prolungato trattamento con acetato di desossicorticosterone, RAAB (1943) osservò una intensificazione dell'effetto pressorio dell'adrenalina.

Lo studio sulle correlazioni funzionali fra ormoni del tessuto interrenale e del cromaffine è stato iniziato con le presenti ricerche sull'azione singola ed associata dell'adrenalina e degli ormoni corticali sull'attività del cuore isolato di rana.

II. — TECNICA

Per la perfusione del cuore isolato di rana esculenta, si è usato il semplice dispositivo illustrato nella fig. 1 a pag. 213. Il cuore è perfuso per la v. cava ascendente seguendo la tecnica descritta in precedenti ricerche (28), con cannula (E) a livello costante, tipo Meneghetti, di piccole dimensioni, con tubi immittente (f) e sfioratore (g) disposti in modo che sugli atri graviti una pressione di 15-20 mm di acqua. Il liquido fuoriesce dalle aorte tagliate, per cui bagna la superficie interna ed esterna del miocardio. Sistema perfusore costituito da tre (o più) bocce Mariotte, l'una grande (A) per il Ringer normale ⁽¹⁾ le altre piccole, di 50-100 cc (B, C) per le soluzioni saline contenenti i farmaci da saggiare, collegate con tubi a livello per i rifornimenti e l'areazione dei liquidi e riunite alla cannula (E) con un rubinetto (D) in vetro a quattro o più vie tipo Chiò. Leva leggerissima interesistente (carico 0,4 g) con amplificazione di 15 volte. Si lasciavano trascorrere 20-30 minuti fra l'inizio della perfusione ed il primo saggio coi farmaci in studio, in modo che l'attività cardiaca si regolarizzasse. L'areazione dei liquidi era interrotta durante la perfusione con adrenalina e con ormoni corticali.

Adrenalina.

Ho usata *l*-adrenalina sintetica purissima (*Sindrenina* Recordati) in sostanza, conservata in fiale (in CO₂ o nel vuoto) di cui preparavo ogni 3-4 giorni soluzione cloridrica al millesimo (pH ca. 4) e fiale di *l*-adrenalina cloridrica dell'I.S.M. ⁽²⁾.

Particolare attenzione (28) è stata dedicata ad eseguire le diluzioni dell'adrenalina all'istante dell'uso nel più breve tempo possibile, partendo da una soluzione madre di adr. 1 : 10.000 in acqua distillata (pH 5), che si conserva all'aria incolore anche per giorni e diluendola al momento dell'impiego, col Ringer, di cui si aumentava lievemente l'alcalinità in modo da mantenere il pH delle diluzioni di adr. a 7,2 (corr.).

Ormoni corticali.

Quali steroli sono liposolubili e quando iniziai queste ricerche non avevo ancora potuto procurarmi un preparato solubile in acqua quale il glucoside del desossicorticosterone (*Percortèn idrosolubile Ciba*) ottenuto da MIESCHER e coll. (21, 22), utilizzabile per iniezioni endovenose e adatto ad esperimenti di perfusione su organi isolati. Me ne

⁽¹⁾ La composizione della soluzione salina usata era la seguente: NaCl 6,0; KCl 0,28; CaCl₂ (anidro) 0,16; NaHCO₃ 0,1-0,2 g per litro di acqua distillata. pH = 7,2 K/Ca = 1,27. Si usarono sali puri, titolando la soluzione madre del CaCl₂.

⁽²⁾ Rinnovo i miei sentiti ringraziamenti al Dott. G. Recordati del Laboratorio farmacologico Reggiano ed al Dott. L. Callegari dell'Istituto Sieroterapico Milanese, che vollero inviarmi ripetuti quantitativi dei prodotti usati per queste ricerche.

valsi nelle indagini che esporrò nelle note seguenti. D'altra parte è noto che nell'estratto purificato di corteccia surrenale, si è determinata la relativa attività di almeno sei composti cristallini e di una frazione amorfa (KUIZENGA e coll., 1940 ed altri). Così pure l'efficacia biologica della cortina non sembra completamente spiegabile sulla base delle entità chimiche conosciute; mentre è ancora in discussione il problema se al desossicorticosterone si possano attribuire, direttamente o indirettamente, tutti gli effetti funzionali della corteccia surrenale, come ha sostenuto VERZAR (1939) oppure solo alcuni come ammettono soprattutto i ricercatori americani. KENDALL (1941) ha ribadito il concetto che la corteccia surrenale non elabora un'unica sostanza che si possa considerare come l'ormone vitale della ghiandola. L'estratto totale della corticale contiene, oltre ad una frazione amorfa, un sorprendente grande numero di steroidi cristallini, strettamente vicini dal lato chimico, di cui alcuni possiedono effetti specifici, qualitativamente differenti l'uno dall'altro, altri sono inattivi.

Era perciò logico iniziare gli esperimenti sull'azione associata adrenalina-corticormoni, con un estratto totale, purificato di corteccia surrenale, tipo cortina di SWINGLE e PFIFFNER. Prescelsi l'*Endocorticalina* dell'Istituto Sieroterapico Milanese, che per la cortesia del Dr. CALLEGARI, potei avere in forma di particolare purezza, *priva di adrenalina, di colina e di acido ascorbico*. L'*Endocorticalina* (E) è preparata secondo i metodi di HARTMANN e di SWINGLE e PFIFFNER, modificati (B. NEPPI, 1933); 1 cc contiene gli ormoni di 25 g di corticale, senza aggiunta di conservatori o di antisettici.

L'*endocorticalina* riduce il reattivo di FOLIN, i sali ferrici, il nitrato d'argento ammoniacale, dà la reazione del blu di Prussia, mentre invece la prova del Comesatti al sublimato, risulta negativa. Le reazioni ossido-riduttive che svelano l'adrenalina, non sono utilizzabili per la sua ricerca nell'estratto corticale (B. NEPPI) per la presenza nella cortina di sostanze riducenti, diverse dall'adr. (SWINGLE e PFIFFNER, 1931; WINTERSTEINER e PFIFFNER, 1935). Dal concentrato purificato di corticale REICHSTEIN (1936) ottenne col reattivo di Girard una frazione chetonica fortemente riducente, e di poi (1937) riferì che il corticosterone ed i suoi esteri riducono la soluzione alcalina di argento e MIESCHER e coll. (1939) osservarono che i 4,5 insaturi, 3-chetosteroidi danno in generale positiva la reazione dello specchio d'argento. Saggi biologici (occhio isolato, mesentero di rana, preparato vasale alla TRENDELENBURG) mi confermarono l'assenza nell'*Endocorticalina* di adr. in quantità dimostrabili, assenza suffragata dalla negatività della prova del COMESATTI, del VIALE e dal fatto che la *endocorticalina* diluita 1:10-1:100 in Ringer a ph 7,2, lasciata all'aria non diviene rosa anche dopo molto tempo.

III. — AZIONE SINGOLA DELL'ADRENALINA E DELL'ENDOCORTICALINA SUL CUORE ISOLATO DI RANA

Adrenalina.

Ho esposto altrove (27) in una dettagliata rassegna critica la vastissima bibliografia sull'azione dell'adr. sul cuore dei bassi vertebrati ed in altro lavoro (28) i risultati da me osservati con l'adrenalina sul cuore di

rana, esperimenti che avevano fra altro lo scopo di stabilire una base per queste ricerche sull'azione associata adrenalina-corticormoni. Mi limito perciò a rammentarne le conclusioni che hanno interesse per le presenti indagini.

Nei cuori isolati di rana, la risposta all'adr. (fra 10^{-5} e 10^{-9}) nella grande maggioranza (70 %) dei casi consiste in *effetti inotropi positivi* più o meno intensi secondo la concentrazione, senza variazioni cronotrope.

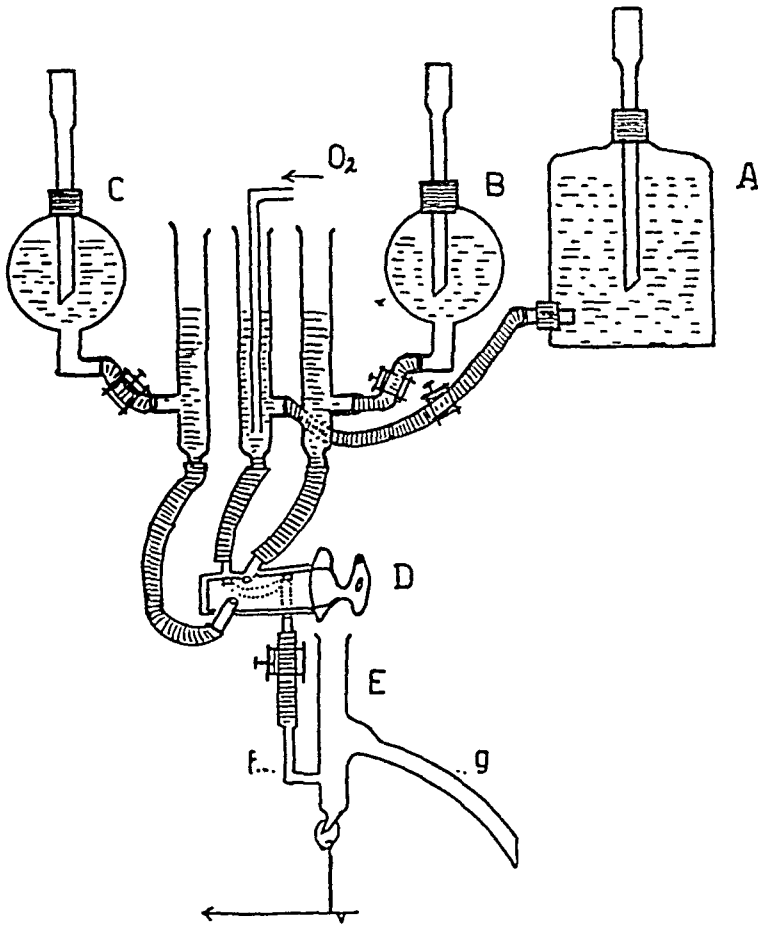


FIG. 1

Dispositivo per la circolazione del cuore di rana (v. il testo)

L'altezza delle contrazioni, raggiunto un massimo, a tale livello permane e prolungandosi l'azione dell'adr. oltre 3-4 minuti, soprattutto con le concentrazioni più elevate, lentamente discende. Questa fase secondaria depressiva, probabilmente di origine tossica, non va confusa con l'*effetto inotropo negativo*, che si osserva in circa il 30 % dei saggi e che consiste sia in una rapida riduzione dell'altezza delle contrazioni al primo agire dell'adr. seguita da aumento dell'inotropismo (*effetto inotropo negativo iniziale*) sia da riduzione dell'altezza delle contrazioni per tutta la

perfusiones col farmaco (*effetto inotropo negativo durevole*). Dopo l'effetto negativo, si osserva di solito effetto di lavacro. Si hanno grandi variazioni individuali nelle risposte dei cuori di rana in toto all'adr.; per cui non si riesce, in un numero limitato di esperimenti a determinare la concentrazione soglia. Non è apparsa relazione evidente fra il manifestarsi dell'azione inotropa positiva o negativa del cuore di rana e la concentrazione dell'adr. nel liquido perfusore.

Per lo studio dell'azione associata era importante e pregiudiziale stabilire che ripetendo le prove sullo stesso cuore la grandezza della risposta inotropa positiva del miocardio all'adrenalina non variava. *E' risultato che i cuori di rana, che reagivano positivamente all'adr. anche dopo 10-15-20 saggi successivi rispondevano alla medesima concentrazione di adr. con un costante aumento nell'altezza delle contrazioni.* Un aumento nell'azione dell'adr. associata ad altri farmaci, avrebbe perciò rappresentato un'attivazione dell'effetto adrenalinico, e non una variazione nella reattività autoctona dell'effettore miocardico alla sola adrenalina.

Endocorticalina (E).

Poco pronunciata è l'azione degli ormoni corticali sul cuore isolato. Con estratti greggi alcoolici ed acquosi, di corteccia surrenale VASARHELYI (1926) osservò aumento del lavoro del cuore isolato di coniglio, 10-20 volte superiore a quello che risultava dall'adr. presente e STERN, RAPOPORT e SCHARIKOWA (1928) sul cuore di rana, effetti crono e inotropi positivi, corrispondenti a quelli prodotti da adrenalina 5×10^{-7} , certamente presente nei loro estratti preparati secondo BATTELLI e STERN. Poichè, come vedremo, la cortina attiva anche notevolmente l'effetto inotropo dell'adr., queste ricerche con estratti corticali impuri, non permettono di sceverare se l'effetto cardiaco osservato dipendesse dagli ormoni corticali o da attivazione delle piccole quantità, di per sè inattive, di adr. presente negli estratti. Con emulsioni in Ringer dell'ormone B isolato da SCHMITZ e KÜHNAU, nel cuore sopravvivate di rane normali e surrenectomizzate, STIPPICH (1935) notò con concentrazioni ottimali (0,1 mg %) inotropismo positivo, senza variazioni cronotrope. con concentrazioni superiori azione inotropa negativa iniziale oppure durevole.

Più significative le ricerche di ASHER e RAUSCHER (1932) i quali con la cortina di SWINGLE e PFIFFNER registrarono, col metodo ottico di FRANK, un significativo aumento nel lavoro eseguito dal cuore di rana. MEIER, GYSEL e MÜLLER (1944) col glucoside del desossicorticosterone a 10^{-4} non rilevarono effetti evidenti sul cuore e sull'intestino isolato di rana e GROSS (1946) pure col Percortèn idrosolubile, nel cuore di rana, osservò solo un piccolo effetto inotropo negativo. THADDEA (1936) scrisse

che nel preparato cuore-polmoni di mammiferi non si vede alcun effetto della cortina sul lavoro del miocardio o sulla circolazione delle coronarie.

Nelle ricerche da me eseguite l'Endocorticalina (E) è stata diluita con Ringer a pH 7,2 partendo da una soluzione base 1 : 100 in acqua dist. rinnovata ogni 1-2 ore. Per ottenere risultati costanti è essenziale, come con l'adrenalina, eseguire le diluzioni all'istante dell'uso. Lavacri intercalari di 15-20 min. Areazione interrotta durante la perfusione con E., la quale durava 2-3 minuti.

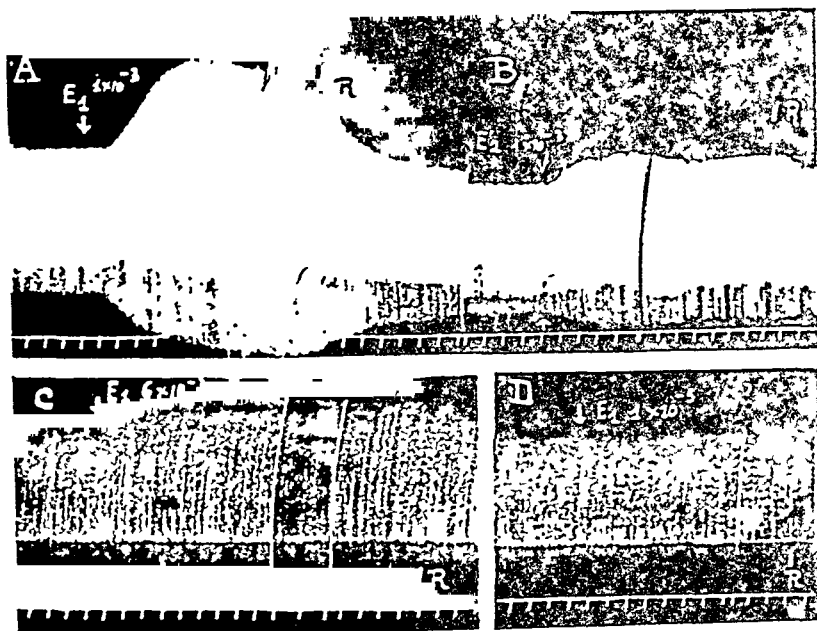


FIG. 2

Azione dell'endocorticalina sul cuore di rana

E_1 da soluzione base appena fatta; E_2 da soluzione base di 48 ore.

Tracciato A: E_1 1 : 1000; Tracciato B: E_2 1 : 1000; Tracciato C: E_1 1 : 6000; Tracciato D: E_2 1 : 100.000.

Il cuore di rana risponde sempre all'Endocorticalina con effetti inotropi positivi, senza variazioni dell'inotropismo. Per osservare effetti motori cospicui ⁽¹⁾ occorrono concentrazioni relativamente elevate, (1 : 1000-

⁽¹⁾ Per giudicare le variazioni di grandezza dell'inotropismo, si misurava sui tracciati l'altezza, in mm, delle contrazioni prima e l'altezza massima rapidamente raggiunta durante il passaggio del farmaco, (eventualmente l'altezza minima in casi di inibizione durevole, come a volte si osservano con l'adrenalina e più di rado con l'endocorticalina) e si calcolava il rapporto ponendo uguale all'unità l'altezza primitiva (*valore unitario*). Nelle misurazioni si prescindeva, quando possibile, dall'effetto di inerzia dovuto alla caduta della leva che è particolarmente pronunciato nella rapida espansione diastolica tipica dell'effetto dell'adr. sul cuore. Non si è tenuto conto di variazioni minori di $\pm 0,2$ mm ($\approx 0,02$ unità). Per giudicare la grandezza delle variazioni dell'inotropismo si seguì il criterio di considerare *piccolo o minimo* un aumento unitario dell'altezza delle contrazioni di 1.1-1.2 volte, *medio* di 1.2-1.5 volte e *cospicuo* di 1.5-2 volte, e più.

1 : 2000), per effetti inotropi medi bastano soluzioni 1 : 5000. Concentrazione minima efficace 1 : 10.000-1 : 20.000. Notevoli variazioni di reattività da cuore a cuore.

La Fig. 2 A dimostra la cospicua risposta motoria di un cuore bene reattivo ad endocorticalina 1 : 1000. L'altezza delle contrazioni da 25 mm sale a 43 mm con un aumento di 1 : 1.72. La frequenza rimane immutata a 25 in 30''.

Con 1 : 6000 di Endocorticalina (FIG. 2 C) l'effetto inotropo positivo è medio, con un aumento da 24 a 30 mm (1 : 1.25). Raggiunto il Mx l'altezza delle contrazioni rimane a tale livello per tutta la durata di azione dell'estratto. Con 1 : 100.000 (FIG. 2 D) l'azione è nulla. In questi esp.ti non si sono osservati effetti inotropi negativi evidenti, nè iniziali nè durevoli. Ma dalle misure eseguite sui cardiogrammi registrati per lo studio dell'azione associata dell'Endocorticalina con l'adrenalina in 14 su 74 prove (19,9 %) con E da sola apparve una minima riduzione dell'altezza delle contrazioni (di 1-2 mm) non rilevabile chiaramente alla semplice ispezione dei tracciati; per cui un effetto inotropo negativo, sia pur minimo, può verificarsi, in ispecie con le maggiori diluzioni di E.

Allo scopo di vedere se in *saggi successivi* la reattività del cuore all'E. variasse; in una ventina di esp.ti si sono ripetuti sullo stesso cuore da tre a sei saggi, intercalati da brevi lavacri di 5-10 min. con concentrazione uguale in ciascuna serie e crescente da 10^{-4} sino a 10^{-3} dall'uno all'altro esperimento. Nelle prime prove qualche oscillazione nelle risposte aveva fatto pensare ad un fenomeno di tachifilassi. Ma moltiplicando sistematicamente gli esperimenti, apparve chiaro che, salvo qualche lieve variazione, *l'incremento nell'altezza delle contrazioni rimane praticamente costante dal primo all'ultimo saggio*, come dimostrano i dati dei sei esp.ti riportati nella Tab. I (ultima col.). Nella Fig. 3 sono riprodotti il I, III e IV saggio dell'espt. N. 10 con E 1 : 5000. *In altre parole con saggi ripetuti non si ha nè tachifilassi, nè attivazione autoctona del miocardio all'endocorticalina.*

Per osservare questa costanza nell'effetto di E è però indispensabile che la diluzione col Ringer lievemente alcalino (pH 7,2) sia eseguita immediatamente prima di eseguire il saggio.

Nei primi esperimenti si era notato che con soluzioni dilute, a volte, coeteris paribus, ad effetti inotropi positivi ben evidenti, se ne intercalavano altri minimi o nulli, che sembravano inspiegabili. La spiegazione però apparve semplice quando ci si accorse che la soluzione base di Endocorticalina 1 : 100, lasciata all'aria alla temperatura ambiente, lentamente perde la sua attività sul cuore. Ad esempio se l'Endocor-

TABELLA I

Saggi successivi con Endocorticalina su cuore di rana

N. esp. Data 1946	Conc.	N. saggio	Altezza Contrazioni		Variaz. unit.
			Prima mm	Dopo mm	
9 21.VI	1×10^{-4}	I	10.5	13	1.24
		II	10	11.5	1.13
		III	10.5	16	1.52
		IV	10	13	1.30
		V	11	14	1.27
		VI	11	15	1.36
				Media	1.30 (± 0.09)
10 18.VI	5×10^{-3}	I	21.5	29	1.35
		II	21	27	1.48
		III	20.5	28	1.48
		IV	20	24	1.20
		V	20.5	29	1.51
		VI	21	30	1.43
				Media	1.40 (± 0.09)
12 19.VI	5×10^{-3}	I	25	32	1.28
		II	27	39	1.44
		III	26	36	1.38
				Media	1.36
15 18.VI	2×10^{-3}	I	16.5	32	2
		II	20	32	1.6
		III	20.5	35	1.7
				Media	1.76
17 21.VI	2×10^{-3}	I	15	28	1.87
		II	15	28	1.87
		III	17	31	1.82
				Media	1.85
19 16.VI	1×10^{-3}	I	15	25	1.67
		II	14	22	1.57
		III	12	22	1.85
				Media	1.67

TABELLA II

Effetto cardiaco dell'endocorticalina in rapporto al tempo di preparazione della soluzione base al 1 %

N. esp.	Conc.	Età sol. base	Variazione altezza contrazioni		Effetto inotropo
			mm	unit.	
2	1×10^{-3}	1 h 30' 48 h	+ 13 ± Ø	1.58 —	forte nullo
3	1×10^{-3}	10' 48 h	+ 18 + 4	1.72 1.17	forte piccolo
6	1×10^{-3}	4 h 8 h 33 h 56 h 104 h	+ 14.5 + 2 ± Ø ± Ø ± Ø	2.26 1.12 — — —	fortissimo piccolo nullo nullo nullo
7	1×10^{-3}	2 h 30' 24 h	+ 10 ± Ø	1.8 —	forte nullo
9	5×10^{-3}	40' 6 h 30'	+ 5 ± Ø	1.26 —	medio nullo
3	1×10^{-4}	1 h 30' 24 h	+ 6 + 1	1.26 —	medio minimo

ticalina si saggia alla concentrazione 1 : 1000, preparandola da una soluzione base 1 : 100 appena fatta, si osserva il fortissimo effetto inotropo positivo riprodotto nella Fig. 2 A; se la stessa diluizione è fatta da una soluzione base di 48 ore (FIG. 2 B) l'effetto è assai piccolo.

Da questo esempio e dai dati della Tab. II risulta che l'estratto di corticale, diluito in Ringer a pH 7,2, tenuto all'aria a temp. ambiente mentre conserva praticamente inalterata la sua attività per 3-4 ore, presenta dopo 6-8 ore una riduzione anche notevole del suo effetto motore sul cuore, che si annulla dopo 24-48 ore. La degradazione è più rapida nelle maggiori diluizioni ed in Ringer lievemente alcalino. E perciò nell'associare l'endocorticalina all'adrenalina, si usarono sempre diluizioni fatte all'istante e si rinnovò la soluzione base ogni 1-2 ore.

I principi attivi della cortina sono termolabili (SWINGLE e PFIFFNER 1931); essi sono rapidamente inattivati a 80° in soluzione alcalina (HARTMANN). Col metodo di SWINGLE e PFIFFNER, le varie estrazioni sono fatte a bassa temperatura. La cortina, senza aggiunta di preservativi,

si conserva per settimane all'aria solo a 6° C. Con la saponificazione alcalina delle acque madri degli estratti C 16 e C 17 REICHSTEIN (1936) ottenne una maggior resa di sostanza A cristallizzabile. Si può perciò presumere che l'inattivazione dell'effetto cardiaco, osservato nel tempo con le soluzioni diluite di endocorticalina, possa dipendere da una lenta idrolisi degli steroidi corticali che in parte almeno vi sarebbero

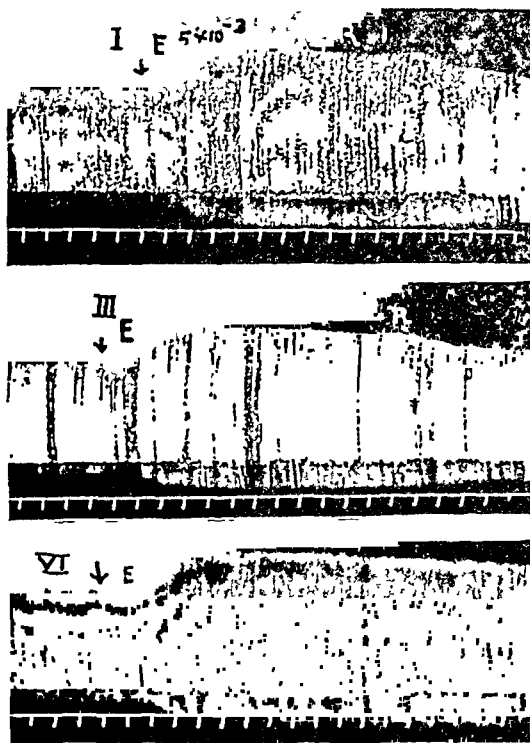


FIG. 3

Esp. N. 10 18-VI-1946. t. 15''. Costanza dell'effetto inotropo in saggi ripetuti con endocorticalina 1 : 5000 sul medesimo cuore.

Sono riprodotti il 1°, 3° e 6° saggio. Lavacri (R) intercalari di 5'.

contenuti in forma di esteri saponificabili, o da altra loro alterazione. MIESCHER e coll. (1938) hanno dimostrato che l'esterificazione con acidi grassi del desossicorticosterone ne esalta notevolmente l'attività biologica.

Come si è detto a pag. 212 nell'endocorticalina sono contenute sostanze riducenti diverse dall'adr. e dall'acido ascorbico. D'altra parte l'acido ascorbico (1.25.000-1 : 100.000) è inattivo sul cuore isolato (PETRJAJEW, SSEROW, 1941).

Si può ritenere che l'effetto inotropo positivo osservato con l'endocorticalina sia da riferirsi agli ormoni corticali che vi sono contenuti. Questa ipotesi è avvalorata dalla prova diretta in quanto che, come

dimostrerò nella nota seguente, anche col glucoside del desossicorticosterone (Percortèn idrosolubile) in forte concentrazione, si osservano effetti inotropi positivi sul cuore di rana. D'altra parte ciò non esclude che le minime tracce non dimostrabili di adr. che possono essere presenti nell'estratto corticale, siano attivate dai corticormoni e che una parte dell'effetto inotropo sul cuore sia riferibile ad una tale attivazione.

In conclusione l'estratto corticale, esente da adrenalina e da acido ascorbico provoca sul cuore isolato di anfibi, puri effetti inotropi positivi, senza modificazioni cronotrope. Effetti inotropi negativi, sono rari e minimi. Questa azione positiva è però modica, osservandosi solo in concentrazioni relativamente elevate, per cui da qualche autore è stata negata.

IV. — AZIONE ASSOCIATA CONTEMPORANEA DELL'ADRENALINA (A) CON L'ENDOCORTICALINA (E) SUL CUORE DI RANA

In queste ricerche si è studiata l'azione associata *contemporanea* di A con E, saggiando su ciascun cuore i due farmaci da soli e poi in miscela, nelle medesime concentrazioni dapprima usate singolarmente. Si sono associate fra loro, in sessanta diverse combinazioni, soluzioni di adrenalina fra 1×10^{-9} e 1×10^{-7} e di endocorticalina fra 1×10^{-5} e 5×10^{-3} ; vale a dire concentrazioni inattive ed efficaci dell'uno e dell'altro membro dell'associazione.

I farmaci erano fatti agire per 3', intercalando lavacri di 10'-15'. Ad ogni esp.to si cambiava il cuore, per cui si lavorò sempre su miocardi in buone condizioni di attività funzionale. Data la variabilità quantitativa e qualitativa nelle risposte del miocardio in toto all'adr., si determinò su *ciascun cuore*, l'effetto singolo dell'A e dell'E, nelle concentrazioni usate in ciascuna associazione. Le miscele di A e di E erano fatte in Ringer all'istante dell'uso, facendo in modo che lo stesso tempo (4'-5') trascorresse per la preparazione delle soluzioni e l'allestimento dei saggi sia per l'azione singola sia per quella associata.

Primo gruppo di esperimenti con A + E.

In un primo gruppo di 74 esp.ti (1-18 luglio 1946; temp. amb. 20°-22°) i saggi si sono succeduti nell'ordine: 1° Adrenalina (A); 2° Endocorticalina (E); 3° A + E; 4° A. Nel 3° saggio si usava un miscuglio di A e di E in Ringer nelle medesime concentrazioni usate prima da sole. Come si è dimostrato nel paragrafo precedente, la risposta del cuore all'A e all'E, è costante in saggi ripetuti con la stessa concentrazione. Ciò si è confermato per l'adrenalina, eseguendo, a volte, un 4° saggio con A alla stessa diluizione del 1°. Questa costanza nelle risposte cardiache è, come ben s'intende, pregiudiziale per lo studio della associazione di

questi farmaci. Dato che nel cuore isolato di rana non si osservano, con adrenalina ed endocorticalina, variazioni significative del cronotropismo, si tenne conto soltanto delle modificazioni dell'inotropismo.

Allo scopo di rendere paragonabili i risultati ottenuti nei vari saggi partendo da altezze iniziali diverse delle contrazioni cardiache, si calcolarono i *valori unitari*, degli effetti singoli ed associati, ponendo uguale all'unità l'altezza iniziale di ciascuna prova. L'effetto dell'associazione $A + E$, sperimentalmente *trovato* (St) è stato espresso dividendo la variazione massima assoluta (in mm) riscontrata durante la perfusione con la miscela $A + E$ per l'altezza iniziale. L'effetto di $A + E$ *calcolato* (Sc) è stato ricavato dividendo la somma algebrica delle variazioni assolute (in mm) degli effetti singoli di A e di E per l'altezza iniziale di A più l'altezza iniziale di E , pure espresse in mm (¹).

In altre parole Sc rappresenta la semisomma delle variazioni $A \pm E$ dell'inotropismo, espresse in valori unitari. Quando St e Sc sono risultati con valori numerici positivi, ($St \geq Sc$) si è calcolato il rapporto St/Sc . Con $St > Sc$, il rapporto esprime di quante volte l'effetto trovato supera quello calcolato, cioè la grandezza dell'attivazione. Con $St = Sc$; $St/Sc = 1$, si ha semplice somma degli effetti singoli dei due farmaci associati. Poichè in pochi esperimenti, St oppure Sc risultarono con valori nulli o negativi, si è calcolata inoltre la loro differenza. $St - Sc = 0$ indica azione addittiva; $St - Sc > 0$ esprime genericamente effetto di attivazione; $St - Sc < 0$ degradazione nell'azione associata dell'adrenalina con l'endocorticalina sul cuore.

Riferisco nei loro dettagli essenziali alcuni esperimenti a titolo di esempio.

Esp.to N. 59 (FIG. 4) 16.VII.46. T. 22° C. Ore 10.25 inizia la perfusione del cuore con Ringer (R). Ore 10.41 1° saggio con adrenalina (A) a 1×10^{-8} (FIG. 4, I); l'altezza delle contrazioni da 44.5 mm sale ad un massimo di 51 mm con una variazione di + 6.5 mm (+ 0.12 in valori unitari). La frequenza dei battiti rimane immutata (36 in 30"). Ore 10.44 lavacro con R. Ore 10.57 2° saggio con E a 5×10^{-3} . Le contrazioni da 38.5 mm salgono a 44 (FIG. 4, II) con un aumento relativo di + 0.14. Ore 11 Ringer. Ore 11.11 3° saggio $A + E$. Si fa agire un miscuglio di adrenalina e di endocorticalina nelle medesime concentrazioni di prima. L'inotropismo sale da 35 a 55 mm (FIG. 4, III). L'effetto di $A + E$ trovato è $St = 20/35 = 0.57$; l'effetto calcolato $Sc = (6.5 + 5.5) / (44.5 + 38.5) = 0.14$. $St/Sc = 0.57/0.14 = 4.3$

In questo caso combinando l'adrenalina con l'estratto corticale, entrambi in concentrazioni attive, si è osservato un effetto associato quattro volte superiore a quello calcolato dall'azione singola dei due

(¹) Indicando con a_1, c_1, c_1 l'altezza iniziale delle contrazioni e con a_2, c_2, c_2 l'altezza massima (minima) rapidamente raggiunta durante l'azione di A , di E e di $A + E$; sarà:
 $St = \frac{c_2 - c_1}{c_1}$; $Sc = \frac{(a_2 - a_1) + (c_2 - c_1)}{a_1 + c_1}$. Non si è tenuto conto di variazioni inferiori a ± 0.4 mm (± 0.04 unità).

farmaci. Su di un altro cuore, associando $A + E$ nelle medesime concentrazioni ($A 1 \times 10^{-8}$; $E 5 \times 10^{-3}$) l'attivazione è risultata soltanto di 1.6 volte (TAB. III).

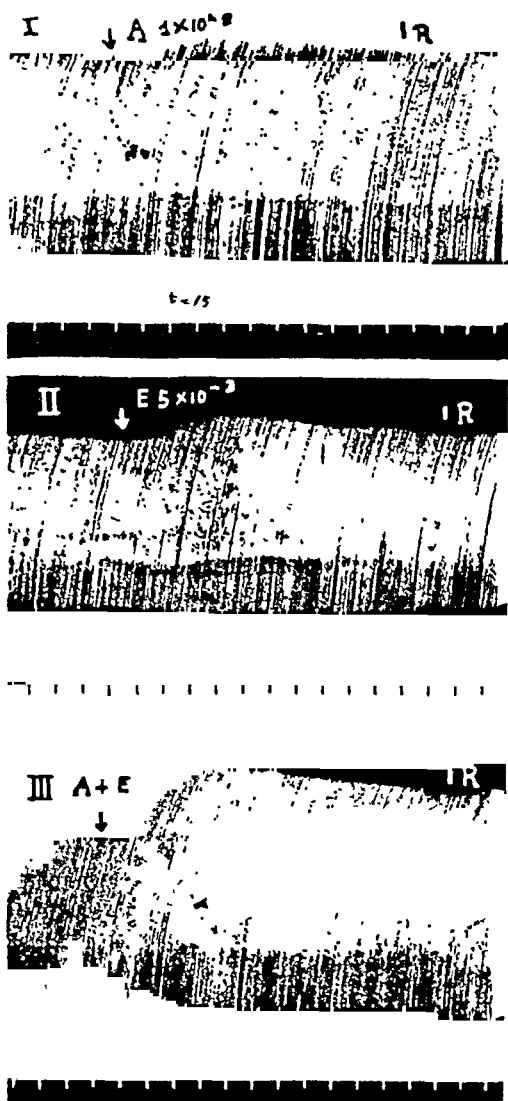


FIG. 4

Azione associata Adrenalina + Endocorticalina

Esp. to N. 59. 16-VII-1946. T. 22° C. $t = 15''$.

I Adrenalina 1×10^{-8} ; II Endocorticalina 5×10^{-3} ; III $A + E$ nelle stesse concentrazioni. Fra I e II 12' di lavacro; fra II e III 10' di lavacro.

Con $A + E$ l'effetto inotropo trovato è circa 4 volte superiore a quello calcolato dagli effetti singoli di A e di E (v. il testo).

Esp.to N. 28. 9.VII.46. Ore 11.28 inizia perfusione con R. Ore 12.10 1° saggio con $A 4 \times 10^{-8}$, minimo effetto inotropo da 22.5 a 23.5 mm. La frequenza delle contrazioni oscilla fra 42 e 43 in 30''. Ore 12.13 R. Ore 12.23 2° saggio con $E 5 \times 10^{-3}$. Le contrazioni salgono da 23 a 34 mm. Ore 12.26 Lavacro. Ore 12.45 3° saggio $A + E$; l'inotropismo cresce da 24 a 38 mm, il cronotropismo permane invariato a 42. Ore 12.52 Ringer. Ore 13.3, 4° saggio $A 4 \times 10^{-8}$. Le contrazioni aumentano da 22 a 23.5 mm, cioè praticamente come al 1° saggio. $St/Sc = 0.58/0.27 = 2.1$. L'effetto dell'associazione $A + E$ è risultato doppio della somma degli effetti singoli.

Nell'es.to seguente, N. 46 del 13.VII.46, documentato nella FIG. 5, si è combinata una concentrazione poco attiva di adrenalina, con una inattiva dell'estratto corticale, e si è osservato un effetto associato 14 volte superiore a quello calcolato. Con $A 4 \times 10^{-8}$ (FIG. 5, I) le contrazioni cardiache salgono da 22 a 25 mm; con $E 2 \times 10^{-4}$ (FIG. 5, II) rimangono immutate a 17.5 mm; con $A + E$ (FIG. 5, III) aumentano da 16 a 32 mm. In tutto l'esperimento la frequenza pulsatoria permane a 38 in 30''. $St/Sc = 14.2$ (Cfr. TAB. VI e FIG. 5).

Esp. to N. 34 10.VI.46. Ore 10.55 inizia la perfusione artificiale. Ore 11.15 $A 1 \times 10^{-8}$; la grandezza delle contrazioni aumenta da 24 a 26 mm, la frequenza rimane immutata a 41. Ore 11.18 Ringer. Ore 11.29. Endocorticalina 1×10^{-5} ; l'altezza contrattoria rimane invariata a 20 mm e così pure non varia il cronotropismo. Ore 11.31 lavacro. Ore 11.49 si saggia una miscela $A + E$ nelle stesse concentrazioni di prima. Fortissimo effetto inotropo positivo da 19 a 33 mm. $St = 0.74$, $Sc = 0.04$, $St/Sc = 18.5$ (TAB. VI).

In questo esperimento, combinando una concentrazione dimostratasi appena attiva di adr. con una inattiva di cortina, si è riscontrata una attivazione assai notevole ($\times 18.5$ volte). In genere l'attivazione più intensa si è ottenuta associando concentrazioni inattive dell'uno, con concentrazioni poco attive dell'altro associato.

Se nella maggioranza degli esp.ti, si è riscontrata attivazione, in pochi (9 su 74) si è registrato un effetto soltanto addittivo, come dimostra il seguente:

Esp. to N. 57. 15.VII.46. Ore 16.30 inizio. Ore 17.3, il cuore reagisce ad A. 6×10^{-7} con un aumento delle contrazioni da 15.2 a 19 mm. Ore 17.5 lavacro. Ore 17.10, E 5×10^{-4} ; l'altezza delle contrazioni rimane immutata a 15 mm. Ore 17.13 Ringer. Ore 17.26 A + E; piccolo aumento da 15 a 16.5 mm. St = 0.1; Sc = 0.1; St/Sc = 1.

L'assenza dell'attivazione non appare però dipendere, o non soltanto, dal rapporto delle concentrazioni associate. Difatti ripetendo su diversi cuori la medesima combinazione (A 6×10^{-7} + E 5×10^{-4}) usata nell'esp.to precedente; si è riscontrato effetto iperaddittivo in due su cinque cuori ed in tre somma di effetti (TAB. III).

Dimostrativi sono stati gli esperimenti seguenti, nei quali si sono combinate soluzioni inattive dei due farmaci associati e nei quali l'attivazione è apparsa evidentissima.

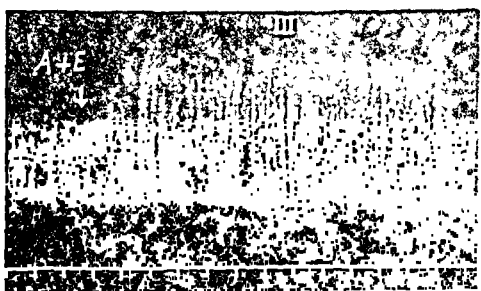
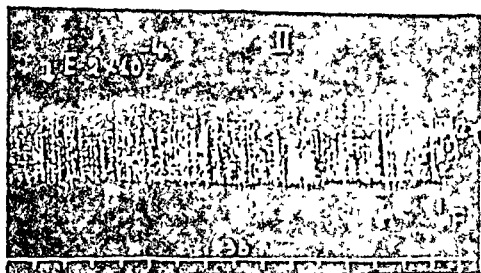
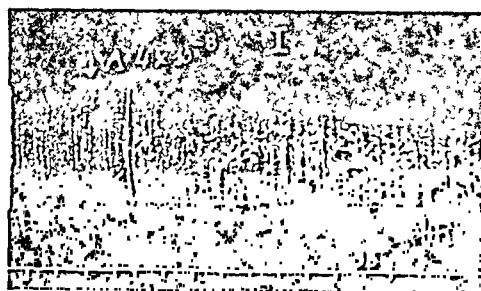


FIG. 5

*Azione associata
Adrenalina + Endocorticalina*

Esp. to N. 46. 16-VII-1946. T. 22°. $t = 15''$. Lavacri intermedi di 8-9'.

I Adrenalina 4×10^{-8} ; II Endocorticalina 2×10^{-4} ; III A -- E nelle stesse concentrazioni. *Effetto associato 14.2 volte superiore alla somma degli effetti singoli.*

Esp.to N. 40. 12.VII.46. Ore 10.15 inizia la perfusione del cuore con Ringer. Ore 10.40 l'altezza delle contrazioni sul tracciato è di 25 mm, la frequenza di 31 in 30''. Si fa passare adrenalina 1×10^{-8} ; altezza e frequenza permangono invariate. Ore 10.43 lavacro. Ore 10.54 E 1×10^{-5} che risulta pure inattiva. L'altezza pulsatoria permane immodificata a 25 mm. Ore 10.57 lavacro. Ore 11.9 A -- E; si osserva un evidente aumento dell'altezza contrattoria da 24 a 26 mm. La frequenza non varia. St = 0.05; Sc = 0. Attivazione evidente ma di grandezze non calcolabile. (TAB. VI).

Azione associata contemporanea dell'adrena

ADRENALINA

ENDOCORTICALINA

	1×10^{-5}				5×10^{-4}				4×10^{-4}		
	St	Sc	St/Sc		St	Sc	St/Sc		St	Sc	St/Sc
1×10^{-9}	+0.08	$\pm \emptyset$	—	>	$\pm \emptyset$	$\pm \emptyset$	—	=	+0.09	$\pm \emptyset$	—
6×10^{-8}	+0.08	$\pm \emptyset$	—	>	+0.27 —0.04 $\pm \emptyset$	+0.2 —0.02 $\pm \emptyset$	1.3 — —	> = =	+0.05	—0.05	—
4×10^{-8}	+0.77	+0.37	2	>	$\pm \emptyset$ +0.18	+0.05 +0.04	— 4.5	\leq >	+0.24	+0.05	4.8
2×10^{-8}	+0.36	+0.20	1.8	>	+0.13	+0.01	(13)	>	+0.11 +0.73	+0.06 +0.14	1.6 5
1×10^{-8}	+0.74	+0.04	18.5	>	+0.22	+0.04	5.5	>	+0.22	$\pm \emptyset$	—
8×10^{-7}	+0.08	+0.12		\leq	+0.18	+0.04	4.5	>	+0.22	$\pm \emptyset$	—
6×10^{-7}	+0.35	+0.1	3.5	>	+0.02 +0.10 +0.60 —0.03 +0.09	+0.05 +0.12 +0.23 —0.03 —0.02	— — 2.6 — —	= = > = >	+0.42 +0.48 +0.37	+0.20 +0.25 +0.04	2.1 1.9 9.2
4×10^{-7}	+0.20 +0.26	+0.12 +0.15	1.6 1.7	> >	+0.46	+0.11	4.1	>	+0.16	+0.02	8
2×10^{-7}	+0.61	+0.18	3.3	>	+0.86	+0.13	6.6	>	+0.53	+0.17	3
1×10^{-7}	+0.58	+0.16	3.6	>	+0.58	+0.16	3.6	>	+0.40	+0.09	4.8
	1×10^{-5}				5×10^{-4}				4×10^{-4}		

ENDOCORTICALINA

St = Effetto inotropo sperimentalmente trovato con A + E in valori unitari.

n l'endocorticalina sul cuore isolato di rana (valori unitari dell'inotropismo)

ENDOCORTICALINA											
2×10^{-4}				1×10^{-4}				5×10^{-3}			
St	Sc	St/Sc		St	Sc	St/Sc		St	Sc	St/Sc	
+0.13	+0.04	3.2	>	+0.40	+0.16	2.5	>	+0.50	+0.10	5	>
-0.07	-0.12	—	>	+0.11	-0.04	2.7	>	+0.44	+0.24	1.8	>
+0.31	+0.20	1.5	>								
+1.0	+0.07	14.2	>	+0.5	+0.15	3.3	>	+0.58	+0.27	2.1	>
+0.12	+0.06	2	>								
+0.17	± 0	—	>	+0.25	+0.06	4	>	+1.23	+0.86	1.4	>
+0.57	+0.07	8.1	>	+0.62	+0.4	1.5	>	+0.74	+0.45	1.6	>
				+2.0	+0.57	3.5	>	+0.57	+0.13	4.3	>
—	—	—	—	+0.35	+0.07	5	>	—	—	—	—
+0.31	+0.08	3.8	>	+0.18	+0.06	3	>	+1.0	+0.51	2	>
				+0.41	+0.06	6.8	>				
-0.12	-0.12	—	=	+0.58	+0.21	2.7	>	+1.32	+0.74	1.8	>
+0.50	+0.09	5.5	>	+0.50	+0.09	5.5	>	+0.46	+0.20	2.3	>
+0.57	+0.23	2.4	>	+1.07	+0.28	3.8	>	+1.06	+0.58	1.8	>
2×10^{-4}				1×10^{-4}				5×10^{-3}			

ADRENALINA

ENDOCORTICALINA											
-----------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

ADRENALINA

Sc = Effetto inotropo *calcolato* (in valori unitari) dall'effetto singolo di A e di E.

La Fig. 6 illustra l'esperimento N. 38 del 10.VII.46, (TAB. V) in cui associando adrenalina 2×10^{-8} con endocorticalina 5×10^{-4} , dimostratasi l'adrenalina da sola inattiva (tracciato I) e l'E appena attiva (tracciato II) si è registrato un netto aumento dell'inotropismo, ben visibile nel tracciato III della Fig. 6, da 27 a 30.5 mm. $St = + 0.13$, $Sc = + 0.01$, $St/Sc = 13$.

Negli esperimenti precedenti, si sono registrati sempre effetti inotropi positivi. Vediamo qualche esempio in cui l'adrenalina oppure l'endocorticalina hanno da sole od associate, dimostrato effetti inotropi negativi.

Esp.to N. 14. 3.VII.46. Ore 17.6 comincia l'irrorazione artificiale del cuore. Ore 17.14 l'altezza delle contrazioni è di 21 mm. Si perfonde adr. 4×10^{-7} . L'altezza dopo essersi ridotta a 19 mm (inibizione iniziale) si stabilizza dopo un minuto a 20 mm ($- 1.0$ mm). Frequenza invariata, a 31 in 30". Ore 17.17 Ringer. Evidente effetto di lavacro con rapido, transitorio aumento dell'altezza delle contrazioni. Ore 17.27 Endocorticalina a 2×10^{-4} ; l'altezza da 21 scende a 17 mm ed a tale livello permane durante tutta la perfusione con E ($- 4$ mm). Ore 17.30 Ringer. L'altezza ritorna subito a 21 mm. Ore 17.40 A + E da 17 mm le pulsazioni si riducono a 15 mm. Ore 17.44 Ringer, ritornano a 17 mm. $St = - 0.12$, $Sc = - 0.12$; $St/Sc = 1$. Effetto associato di semplice somma.

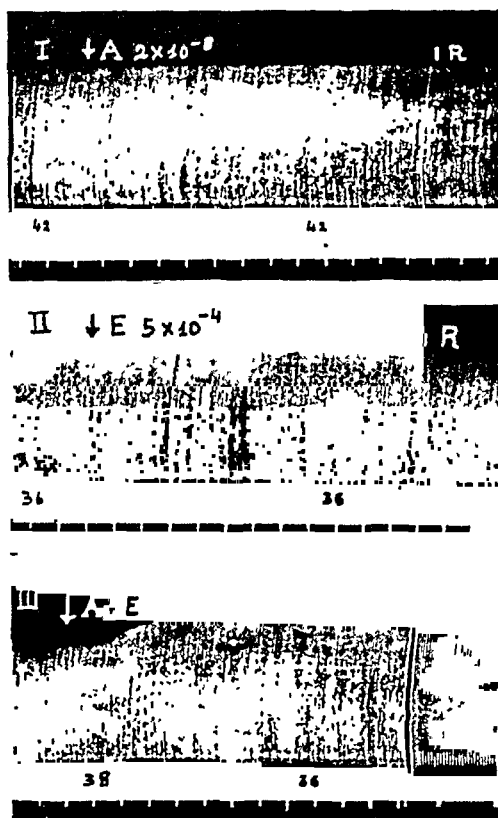


FIG. 6

Azione associata contemporanea adrenalina più endocorticalina

Esp.to N. 38. 10-VII-1946. $t = 15''$. Lavacri intermedi di $10'$.

I Adrenalina 2×10^{-8} ; II Endocorticalina 5×10^{-4} ; III A + E nelle stesse concentrazioni da sole inattive. *Effetto inotropo indicante evidente attivazione.*

Esp.to N. 32. 10.VII.46. T. 22°. Ore 8.55 inizio. Ore 9.15 A 1×10^{-8} l'altezza delle contrazioni da 35 sale a 41 mm ($+ 6$ mm). Ore 9.19 R. Ore 9.30 E 2×10^{-4} . Le contrazioni da 31 scendono a 30 mm ($- 1$ mm); Ore 9.33 Ringer. Ore 9.43 A + E; da 27 salgono a 42.5 con un aumento di $+ 15.5$ mm; $St = 0.57$, $Sc = 0.07$; $St/Sc = 8.1$. L'attivazione in questo caso è stata notevole, 8 volte superiore all'effetto calcolato.

Esp.to N. 72. 18.VII.46. T. 23°. Il cuore è allacciato alla leva a ore 14.32. Dopo 20 minuti di perfusione con R. si tratta con A a 2×10^{-8} . Minima riduzione inotropica da 26.5 a 25 mm ($- 1.5$ mm). Ore 14.45 R. Ore 14.54 si saggia E 2×10^{-4} , nessuna variazione nell'altezza delle contrazioni che permangono a 24 mm. Frequenza sempre invariata. Ore 15.1 R. Ore 15.10 A + E, l'altezza delle contrazioni sale da 23 a 27 mm

(-4 mm). Ore 15.13 R. St = -0.17, Sc = -0.03. La lieve azione inotropica negativa dell'adr., dopo associazione con l'estratto corticale si è trasformata in evidente azione motoria positiva.

In un altro esperimento (N. 4) l'attivazione è apparsa dalla riduzione dell'effetto negativo dei due farmaci associati. Con $A 6 \times 10^{-8}$ si ebbe un effetto inotropo negativo di -4 mm; con $E 2 \times 10^{-4}$ inibizione di -3 mm; con $A + E$ -2 mm. St = -0.07, Sc = -0.12.

Dai dati analitici di tutte le misurazioni eseguite sui tracciati dei 74 esperimenti di questo gruppo, si è ricavata la Tabella III, nella quale sono indicati i valori dell'azione associata Adrenalina + Endocorticalina, trovata (St) calcolata (Sc) e del rapporto St/Sc. Quando questo rapporto non è stato calcolabile, dalla differenza St-Sc, per brevità non indicata nella tabella, si è ricavato se l'effetto associato è maggiore ($>$) uguale ($=$) o minore ($<$) della semisomma algebrica degli effetti singoli dei due ormoni, se cioè l'effetto associato è di *attivazione*, di *addizione* o di *degradazione*.

2° e 3° Gruppo di esperimenti sull'azione associata contemporanea adrenalina + endocorticalina.

In un secondo più breve gruppo di 21 esperimenti, le prove si susseguirono nell'ordine: 1) $A + E$; 2) A; 3) E; 4) $A + E$ usando adrenalina fra 6×10^{-8} e 4×10^{-7} ed endocorticalina fra 1×10^{-5} e 1×10^{-4} . Questi esperimenti sono stati eseguiti alla fine del luglio '46, in giorni nei quali, un improvviso rialzo termico fece salire la temperatura ambiente da 20°-22° a 27°-28°, condizione alla quale dapprima non si era data sufficiente attenzione e che invece può in gran parte spiegare i risultati poco chiari o contraddittori ottenuti in questa serie. Difatti in circa la metà dei saggi di questo gruppo con l'adrenalina sola si ebbe risposta nulla, anche con concentrazioni di norma altamente attive sul cuore ed in 7 su 21 esp.ti, l'effetto risultò nullo in tutti i quattro saggi di ciascuna serie. Nei 14 esperimenti nei quali si ebbe risposta positiva con $A + E$, confrontando l'effetto calcolato con quello trovato nel 4° saggio risultò attivazione in 11, confrontando l'effetto calcolato con quello trovato nel 1° saggio solo in 5 e negli altri addizione o minima degradazione. Questa discordanza nei risultati della medesima associazione, sullo stesso cuore, saggiando la miscela $A + E$ all'inizio (1°) ed alla fine (4° saggio) dell'esperimento, aveva dapprima fatto pensare (26) che il cuore di rana, in ottima attività funzionale, reagisse all'adrenalina da sola ed associata alla cortina, meno di quando questi farmaci avevano agito più volte, che cioè il cuore potesse presentare variazioni, in più o in

meno, nella reattività alla adrenalina, che avrebbero potuto, in parte almeno infirmare le conclusioni sull'azione associata. Sono stati questi risultati che suggerirono di eseguire una ricerca sistematica, la quale dimostrò (28), come si è detto che anche dopo 10-20 saggi successivi il cuore di rana risponde con costante effetto inotropo alla medesima concentrazione di adrenalina. E lo stesso è apparso, come si è visto nel capitolo III, con l'endocorticalina. La spiegazione dei risultati non sempre concordanti di questo secondo gruppo sperimentale, doveva dipendere da altra condizione, l'aumento della temperatura ambiente, con conseguente accelerata velocità di degradazione ossidativa dell'adrenalina e degli ormoni corticali, nei sia pur pochi minuti necessari per la preparazione delle soluzioni e l'allestimento del saggio, e che era passata inosservata, poichè alle grandi diluzioni usate le soluzioni di adrenalina non si colorano.

E che questa interpretazione fosse nel vero, è risultato con evidenza in un terzo gruppo di 10 esperimenti, eseguito nel successivo ottobre con la medesima serie di saggi del secondo, a temperatura ambiente di 18°-20° e facendo le diluzioni di *L*-adrenalina dalla soluzione madre di Sindrenina Recordati 0,1 per mille in acqua distillata e quella di endocorticalina pure da soluzione madre 1 % in acqua dist. con alcuni accorgimenti per ridurre al minimo il tempo di esecuzione delle diluzioni. In tutti questi esperimenti si ottenne un evidente effetto iperaddittivo (da 2 a 5 volte) per l'associazione $A + E$, sia nel 1° sia nel 4° saggio, rispetto all'effetto calcolato, con buona corrispondenza anche nella grandezza dei valori fra il saggio iniziale e quello finale. Vale a dire una piena e chiara conferma dell'attivazione riscontrata nel primo più numeroso gruppo di esperimenti.

V. — COMMENTO E CONCLUSIONI

Col procedimento adottato, l'adrenalina e l'estratto corticale, si sono associati in modo da combinare fra loro: *a*) concentrazioni subliminari dell'uno e dell'altro farmaco; *b*) concentrazioni inattive di un membro dell'associazione con concentrazioni efficaci dell'altro e *c*) concentrazioni attive dei due farmaci. Si sono cioè prese in considerazione le tre possibilità di una tale indagine, estendendola a circa 60 combinazioni diverse di $A + E$.

Poichè il miocardio reagisce a questi ormoni con risposte inotrope positive o negative, senza variazioni cronotrope apprezzabili, il giudizio sull'effetto associato si è ricavato paragonando l'effetto trovato con

le miscele A + E con quello calcolato dalla semisomma algebrica degli effetti singoli.

Esaminando i risultati ottenuti, si può affermare che nei più vari rapporti di concentrazione, associando adrenalina con corticalina, sul cuore isolato di rana, si ottengono effetti inotropi maggiori della somma delle singole risposte di A e di E. L'ipotesi di partenza non poteva trovare migliore conferma sperimentale.

L'azione ultra addittiva si è riscontrata in 65 su 74 esperimenti (87.8 %) del primo gruppo; mentre dei rimanenti 9, in 7 si notarono effetti addittivi ed in 2 accenno a degradazione. Questa piccola percentuale (12.2 %) di effetti di somma o di degradazione apparve con concentrazioni inefficaci oppure in cuori scarsamente reattivi; ma ciò che più conta, anche con le combinazioni A + E, con le quali l'attivazione sembrava mancare, ripetendo la prova con la medesima combinazione su altri cuori, si trovò effetto ultraddittivo (TAB. III).

Si può perciò concludere *che l'effetto iperaddittivo è certamente dimostrabile in tutti i rapporti di concentrazione esaminati dell'adrenalina e dell'endocorticalina*, come appare dalla quarta colonna di ciascuna combinazione, riportata nella Tab. III, in cui almeno qualche volta i segni $>$ si ritrovano in tutte le combinazioni saggiate. Senza voler escludere che possano esservi rapporti di concentrazione dei due ormoni associati, ai quali l'attivazione si manifesti meno facilmente, è certo che in qualsiasi rapporto si riesce a dimostrarla.

Degradazione, appena accennata, è apparsa eccezionale (in 2 su 74 esp.ti del primo gruppo, in 3 su 14 del secondo) e così pure raramente si registrarono effetti di addizione. Per altre associazioni ad esempio per i convulsivanti dallo SCREMIN (1928), per gli anestetici locali da RABBENO e CAVALLI (1939), si è osservato che i processi di addizione, attivazione, degradazione variano in funzione dei rapporti di quantità dei due farmaci associati; invece con l'associazione adrenalina-estratto corticale, l'effetto iperaddittivo è apparso la norma, indipendentemente dal rapporto di concentrazione dei farmaci associati. Questa associazione sembra perciò seguire la nota regola del BÜRGI.

Esaminiamo la grandezza dell'attivazione riscontrata, che spesso è stata cospicua. La tabella IV ci dice che dei 65 esperimenti con effetto ultraddittivo in 56 il rapporto St/Sc è stato calcolabile. Nel 17.5 % del totale l'attivazione è stata piccola (da $\times 1.3$ a $\times 2$); nel 45.9 % media (da $\times 2$ a $\times 6$), nel 12.2 % grande (da $\times 6$ a $\times 18$ volte la somma calcolata).

Non sempre l'attivazione è dipesa da un aumento dell'effetto inotropo positivo della miscela adrenalina + endocorticalina. In pochi casi (TAB. III) l'attivazione è risultata (come con A 5×10^{-8} + E 2×10^{-4})

TABELLA IV

St/Sc	N. esp. ti		N. esp. ti	
Addizione o minima degradazione			9	12.2 %
1.1-1.9 Attivazione	13	17.5 %		
2.0-2.9 »	11	45.9 %		
3.0-3.9 »	11			
4.0-4.9 »	6			
5.0-5.9 »	6			
6.0-6.9 »	2	12.2 %		
7.0-7.9 »	0			
8.0-8.9 »	2			
9.0-9.9 »	1			
..... »				
10-18 »	4			
Indefinito »	9	12.2 %		
	—	—		
Attivazione	65	87.8 %	65	87.8 %
	—	—	—	—
Totale			74	100

da una diminuzione dell'effetto negativo calcolato; oppure, come con $A 6 \times 10^{-8} + E 4 \times 10^{-4}$, dalla inversione di un effetto negativo a positivo.

Ripetendo la prova su cuori diversi, *con la medesima combinazione* $A + E$, si è riscontrato che l'entità dell'attivazione varia da cuore a cuore e con differenze anche notevoli (TAB. III). Per es. con la miscela $A 4 \times 10^{-8} + E 2 \times 10^{-4}$, su di un cuore l'effetto associato è stato 1.5 volte il calcolato, nell'altro 14.2 volte superiore a quello addittivo teorico.

Non si può escludere che queste differenze oltre alla variabile reattività dei miocardi possano essere dipese da un inizio di degradazione ossidativa dell'adrenalina o di una scissione degli esteri degli steroidi della cortina, nell'ambiente lievemente alcalino del Ringer; per quanto che la costanza delle risposte coi saggi ripetuti con la medesima concentrazione di A o di E (con soluzioni fatte all'istante dell'uso) faccia ritenere trascurabile questa causa d'errore.

Da sottolineare gli esperimenti nei quali combinando fra loro concentrazioni-sublminari di adrenalina e di endocorticalina, si ottenne effetto inotropo positivo e quelli nei quali concentrazioni sublminari di adrenalina divennero attive in presenza dell'estratto corticale, oppure concentrazioni sotto la soglia di endocorticalina esaltarono, a volte in

TABELLA V

Attivazione ottenuta combinando concentrazioni inefficaci di Adrenalina (A) e di Endocorticalina (E) oppure concentrazioni inefficaci dell'uno con attive dell'altro farmaco

N.	A Conc.	E Conc.	Effetto singolo				Effetto combinato			$\frac{St}{Sc}$	Risul- tato
			A		E		A + E	A + E	A + E		
			mm	mm	v.u.	v.u.	trov. mm	trov. v.u.	calc. v.u.		
								St	Sc		
40	1×10^{-8}	1×10^{-8}	0	0	0	0	0.2	0.08	0	(1)	Attivaz.
54	"	4×10^{-8}	0	0	0	0	0.2	0.09	0	(1)	"
2	6×10^{-8}	1×10^{-8}	0	0	0	0	0.2	0.08	0	(1)	"
45	4×10^{-8}	5×10^{-8}	0.2	0	0.08	0	0.4	0.18	0.04	4.5	"
46	"	2×10^{-8}	0.3	0	0.12	0	0.12	1.0	0.07	14.2	"
38	2×10^{-8}	5×10^{-8}	0	0.5	0	0.02	3.5	0.13	0.01	(13)	"
8	"	4×10^{-8}	0	0.2	0	0.11	0.2	0.11	0.06	1.6	"
72	"	2×10^{-8}	1.5	0	0.06	0	0.4	0.17	0	(1)	"
34	1×10^{-8}	1×10^{-8}	0.2	0	0.08	0	0.14	0.74	0.04	18.5	"
64	8×10^{-8}	4×10^{-8}	0.2	0	0.01	0	0.05	0.22	0	(1)	"
13	4×10^{-8}	4×10^{-8}	0.1	0	0.04	0	3.5	0.16	0.02	8	"

v.u. valori unitari; (1) Valore indefinito del rapporto St/Sc . St effetto combinato trovato in valori unitari; Sc effetto combinato calcolato dagli effetti singoli di A e di E.

modo cospicuo, l'effetto dell'adrenalina. Nella tab. V sono riportati alcuni di questi esperimenti.

In conclusione si è constatato che: a) effetti iperaddittivi si riscontrano in tutti i rapporti di concentrazione dell'associazione adrenalina + endocorticalina; b) anche quando si registra semplice somma, ripetendo la prova su altri cuori, con la stessa combinazione, si può constatare attivazione; c) la grandezza dell'effetto iperaddittivo varia da cuore a cuore anche con la medesima combinazione delle concentrazioni di A + E; d) concentrazioni subliminari di adrenalina divengono efficaci in presenza dell'estratto corticale, e viceversa.

Tutti questi fatti sembrano parlare a favore dell'ipotesi che l'attivazione riscontrata sia riferibile ad una sensibilizzazione del miocardio, ad aumentata reattività dei gruppi eccitomotori (o a diminuita reattività dei gruppi inibitori) adrenergici dei recettori miocardici, (SPADOLINI 38), a condizioni intrinseche al cuore; piuttosto che a processi svolgentisi in vitro nelle miscele adrenalina-endocorticalina, a fattori estrinseci.

Infatti in quest'ultimo caso, ripetendo la prova su cuori diversi, con

gli stessi rapporti di concentrazione dei due ormoni associati; cioè con la stessa combinazione, l'effetto associato avrebbe dovuto risultare dello stesso segno e dello stesso ordine di grandezza.

Poichè però altre considerazioni sembrano accordarsi anche con l'ipotesi, pure suggestiva, della formazione di «unioni» dell'adrenalina coi corticormoni o con altri componenti dell'estratto corticale, converrà rimandare la discussione sul determinismo dell'attivazione osservata nell'*azione associata contemporanea* adrenalina-corticormoni, a quando altri fatti siano stati assodati e limitarsi per ora a prospettare alcune ipotesi di lavoro, che si stanno sottoponendo all'esperimento.

In primo luogo converrà vedere se l'attivazione dell'effetto cardiaco dell'adrenalina dipenda dagli ormoni presenti nell'estratto corticale o da altre sostanze.

Il chimismo dell'attivazione adrenalinica in presenza di cortina, può dipendere da una sensibilizzazione dei recettori adrenergici del miocardio, oppure da processi svolgentisi (in vivo, in vitro) fra adrenalina e steroidi corticali. Processi, i quali possono riferirsi a due ordini di fenomeni: *a)* ad inibizione dell'ossidazione dell'adrenalina; *b)* a formazione di combinazioni (chimiche, chimico-fisiche) fra adrenalina e steroidi, unioni più attive dell'adrenalina contenutavi.

Alcuni steroidi corticali sono dotati di proprietà riducenti. L'azione antiossigeno sull'adrenalina potrebbe essere esplicata sia da steroidi dotati di attività corticosurrenale, sia da steroidi biologicamente inattivi, dato che dagli estratti surrenali sono stati isolati numerosi composti sterici cristallizzati, in parte privi di azioni ormoniche, oltre ad una porzione amorfa (Cfr. KENDALL 1941). L'esistenza di complessi adrenalino-lipoidei, é stata prospettata da KONSHEGG e MONAUNI, da WESTPHAL e SIEVERT. Con una modificazione del metodo colorimetrico di SHAW al molibdato di arsenico, RAAB aveva dapprima (1941, *a*, *b*, *c*, *d*) ritenuto si determinassero nel sangue e nei tessuti, accanto ad adrenalina libera, composti dell'adrenalina con steroli corticali; ma successive ricerche gli fecero escludere la partecipazione degli steroli alla reazione blu finale; per cui RAAB nei suoi più recenti lavori (1942 e seg.) rinunciò alla ipotesi di unioni adrenalino-corticali.

I noltre si può ammettere la possibilità di unioni dell'adrenalina con altri lipoidi (lecitine) del sangue e dei tessuti. SWINGLE e PFIFFNER (1931) avevano constatato che l'adr. diviene alquanto solubile in benzene in presenza di fosfolipidi ad avevano ammessa la presenza nei surreni di una forma di adrenalina solubile nei solventi organici. KENDALL (1942) e RAAB (1943 *f*) osservarono che l'adrenalina si scioglie in cloroformio in presenza di lecitina.

Questi due processi — ritardo nell'autossidazione; unioni adrenalino-lipoidi — possono manifestarsi sia *in vitro* nelle miscele adrenalina-cortina, sia *in vivo* a livello dei recettori adrenergici dei visceri ed a priori non si escludono a vicenda, poichè, come per l'ascorbato di adrenalina, sale cristallino stabile ottenuto da HOFFMANN e MARQUARDT (1938) e studiato da MARQUARDT (1938, 1940) e da MEIDINGER (1946), l'ipotetica unione adrenalino-steroidi potrebbe portare ad un prodotto meno facilmente ossidabile e forse più attivo dell'adrenalina contenutavi.

SUMMARY

The action of adrenalin (A) and of an adrenal cortex extract (Endocorticalin I.S.M. [E]) on frog's heart muscle was studied. The inotropic effect, without chronotropic variations remains constant during repeated trials both with A and E on the same heart. The contemporary associated action was investigated perfusing the heart with A plus E mixtures of the same concentrations assayed singularly with both hormones.

Combining concentrations of A from $1 \cdot 10^{-5}$ to $1 \cdot 10^{-7}$ with concentrations of E from $1 \cdot 10^{-5}$ to $1 \cdot 10^{-6}$, the associated effect on frog's heart is generally hyper-additive and exceptionally are observed effects of pure addition or of slightest degradation. The activation was noted on all the 60 assayed combinations of the association adrenalin-endocorticalin; therefore it seems to be independent from the concentration report of the associated hormone.

The magnitude of the hyperadditive effect change from heart to heart and may be conspicuous. Calculating, when possible, the relation St/Sc — between inotropic increase found (St) with A + E and that calculated (Sc) from the algebraic sum of the single effects of A and E — it has resulted that: on 17.5 % the activation was small (less of ≈ 2), on 45.9 % middle (from ≈ 2 to ≈ 6) on 12.2 % great (from ≈ 6 to ≈ 18) on 12.2 % remarkable but not measurable. On the rest 12.2 % it was observed addition or slight degradation.

Inactive concentrations of adrenalin become efficient associated with suprarenal cortex extract, and reciprocally. Some suppositions are mentioned in order to explain the activation of adrenalin produced by adrenal cortex extract on frog's heart muscle.

BIBLIOGRAFIA

1. — ASHER, L., RAUSHER, P. *Klin. Wschrft.*, 1932, 11/II, 2036.
2. — CANNON, W. B., LISSAK, K. *Am. J. Physiol.*, 1939, 125, 765.
3. — DRESEL, K., STERNHEIMER, R. *Zeit. f. Klin. Med.*, 1928, 107, 759 e 785.
4. — EULER, U. S. *Acta Physiol. Scand.*, 1946, 11, 168; 1948, 16, 63. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1948, 77, 477.
5. — GROSS, F. *Experientia*, 1946, 2, 191 (C.A. 40, 6154/1).
6. — HOFFMANN, F., MARQUARDT, P. *Byk-Gulden Werke Chem. Fabrik*. Berlin Patent, 1938. *Ch. Zbl.*, 1941, I, 928.

7. — KENDALL, E. C. *Y.A.M.A.*, 1941, 116, 2394.
8. — KENDALL, E. C. *Endocrinology*, 1942, 30, 853.
9. — KOLMER, W. *Pflüger's A. f. ges. Phys.*, 1912, 144, 316; *Arch. f. mikrosk. Anatomie*, 1918, 91, 1.
10. — KONSHEGG, TH. *Zeit. exp. Med.*, 1932, 81, 559.
11. — KONSHEGG, TH., MONAUNI, J. *Zeit. f. klin. Med.*, 1937, 131, 99.
12. — KUIZENGA, M. H. et alia. *Am. J. Physiol.*, 1940, 130, 298.
13. — LUCADOU, W. *Beiträge z. Anat. Path.*, 1938, 101, 197.
14. — MANASSE, P. *Virchow's A. f. Path. Anat. u. Phys.*, 1894, 135, 263.
15. — MARQUARDT, P. *Klin. Wschrft.*, 1938, 17, 1445.
16. — MARQUARDT, P. *Schweiz. med. Wschrft.*, 1940, 36; *Enzymologica Acta Biocatalitica*, 1948, 12, 246.
17. — MEIDINGER, F. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1946, 72, 264.
18. — MEIER, R., GYSEL, H., MÜLLER, R. *Schweiz. med. Wschrft.*, 1944, 74, 4, 93.
19. — MIESCHER, K., FISCHER, W. H., TSCHOPP, E. *Nature*, 1938, 142, 435.
20. — MIESCHER, K., WETTSCHER, A., SCHOLZ, C. *Helv. Chim. Acta*, 1939, 22, 894.
21. — MIESCHER, K., FISCHER, W. H., MEYSTRE, CH. *Helv. Chim. Acta*, 1942, 25, 40.
22. — MIESCHER, K., MEYSTRE, CH. *Helv. Chim. Acta*, 1943, 26, 224.
23. — NEPPI, B. *Terapia*, 1933.
24. — PETRJAJEV, J.D., SSEROW, S. T. *Bull. exp. Biol. Med. (U.R.R.S.)*, 1941, 11, 190.
25. — RAAB, W. a) *Endocrinology*, 1941, 28, 325; b) *Ivi*, 1941, 29, 126; c) *Ivi*, 1941, 29, 564; d) *Arch. of int. Med.*, 1941, 68, 713; e) *Amer. Heart J.*, 1942, 24, 365; f) *Endocrinology*, 1943, 32, 226; g) *Biochem. J.*, 1943, 47, 470; h) *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1944, 82, 330; i) *Wiener Zeit. f. inn. Medizin*, 1948, 29, Jahr., 1 Hft., 1.
26. — RABBENO, A. *Boll. Soc. ital. Biol. Sper.*, 1946, 22, 1186 e 1188.
27. — RABBENO, A. *Archivio di Fisiol.*, 1948, 48, 112.
28. — RABBENO, A. *Archivio di Fisiol.*, 1948, 48, 176.
29. — RABBENO. Rapporti fra interrenale e cromaffine (Inedito).
30. — RABBENO, A. (Inedito).
31. — RABBENO, A., CAVALLI, F. *Arch. intern. Pharmacodyn.*, 1939, 61, 11.
32. — REICHSTEIN, T. *Helv. Chim. Acta*, 1936, 19, 29.
33. — SCHOLZ, C., MIESCHER, K. WETTSCHER, A. *Helv. Chim. Acta*, 1939, 22, 894.

34. — SANDERS, E. *Arch. f. exp. Path. Pharm.*, 1938, 188, 657.
35. — SCREMIN, L. *Arch. di Scienze Biol.*, 1928, 12, 262.
36. — SHAW, F. H. *Bioch. J.*, 1938, 3, 19.
37. — SHÜRGER. *Klin. Wschft.*, 1947, 593.
38. — SPADOLINI, I. La regolazione neuro-umorale dei visceri. La Nuova Italia, 1946. *Arch. di Fisiol.*, 1940, 50, f. 1.
39. — SWINGLE, W. W., PIETNER, J. J. *Am. J. Physiol.*, 1931, 98, 144.
40. — STERN, L., RAPOPORT, S. J., SCHARIKOWA, A. F. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1928, 99, 687.
41. — STIPPICH, K. *Zeit. f. Biologie*, 1935, 96, 522.
42. — VASARHELYI, B. *Magyar Orvosi Archivum*, 1926, 27, 251 (Chem. Zbl.).
43. — VERZÀR, F. Die Funktion der Nebennierenrinde. 1939. Basel. B. Schwabe.
44. — VERZÀR, F. Vitamine u. Hormone, 1941, 1, 85.
45. — VIALE, G. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 1930, 5, 1163.
46. — VIALE, G. *Rassegna medica*, 1933, n. 2.
47. — WESTPHAL, K., HERMANN, F. *Zeit. f. klin. Med.*, 1925, 101, 566.
48. — WESTPHAL, K., SIEVERT, CHR. *Zeit. f. klin. Med.*, 1938, 133, 311.
49. — WINTERSTEINER, PFIFFNER, J. J. *J. Biol. Chem.*, 1934, 105, XXVIII.
50. — THADDEA, S. Die Nebennierenrinde. Thieme. Leipzig, 1936.

DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY, UNIVERSITY OF UTAH COLLEGE OF MEDICINE
SALT LAKE CITY, UTAH

STUDIES ON THE LAXATIVE ACTIVITY OF TRIPHENYLMETHANE DERIVATIVES II ⁽¹⁾

Physicochemical aspects of the potency difference between
"yellow phenolphthalein" and U. S. P. phenolphthalein

BY

S. LOEWE AND IDA A. LOEWE

(Received for publication 25-2-1949).

Two forms of phenolphthalein are employed medicinally for laxative action: (1) a commercial-grade product, usually called "yellow phenolphthalein" (Y. Pht.), and (2) a high-grade product, "white phenolphthalein" of U.S.P. purity (W. Pht.). The technical names originate from the fact that, whereas W. Pht. is practically colorless, some of the numerous by-products present in commercial-grade phenolphthalein are yellowish to deep-brownish in color. Rather early in the history of phenolphthalein the impression developed that Y. Pht. was markedly superior in laxative activity to W. Pht. Experimental confirmation of this impression came only in 1934 (2) when Y. Pht. was shown to be about three times as active as W. Pht. in the rhesus monkey, the only species of laboratory animal suitable for such laxative studies.

Numerous and conflicting views concerning mechanism were advanced in explanation of the superior laxative potency of Y. Pht., even before the phenomenon was conclusively demonstrated. Among these were (a) pharmacodynamic explanations such as the presence of an unidentified laxative chemical among the by-products, having an incomparably higher potency than phenolphthalein (3), or of a laxative from the class of hydroxy-anthraquinones, capable of imparting yellow color as well

⁽¹⁾ For previous paper, see (1).

as extra-potency (4,5; compare : 6,7); and (b) physico-chemical mechanisms, such as greater rate of solution in water (8, 9), smaller particle size increasing the solution rate in water (10) or protective colloidal by-products causing phenolphthalein to be precipitated in smaller particles in the process of manufacturing (11). Only after the rhesus monkey was shown to be a reliable test animal for comparing the laxative activities of phenolphthalein preparations (12, 13, 14, 15) could one endeavor to investigate the possible factors underlying the difference in potency between W. Pht. and Y. Pht. This present study is concerned with the problem whether the phenomenon has a pharmacodynamic or a physico-chemical basis.

PROCEDURES

The phenolphthalein preparations employed in this work and the methods used for studying the correlation between their properties and laxative activity will be described in the sections concerned. The procedure for determining the laxative activity was the previously described method of bioassay in the rhesus monkey (12, 13, 14, 15) (1). The bioassay results are expressed in terms of relative potency (P) of the test preparation in reference to that of the standard (W. Pht. = 100).

The present study often deals with preparations containing one or more components in addition to the main laxative component. In such products, another aspect of potency is important, namely, the specific potency (Sp. P.). Sp. P. is the per cent ratio between the actual potency P of a combination and the summative potency, P_s , which it would exhibit in the case of a merely summative effect of the components.

$$\text{Sp. P.} = 100 P/P_s \quad (1)$$

If a combination is composed of a , b , c , etc., per cent of the components A, B, C, etc., having the potencies P_A , P_B , P_C , etc., respectively,

$$P_s = 1/100 [(a \times P_A) + (b \times P_B) + (c \times P_C) + \dots] \quad (2)$$

By definition, for every pure substance, Sp. P. = 100.

Determinations of Sp. P. are indispensable for a study of the basis of the potency of a combination. If Sp. P. of the combination is 100, its potency is due to mere summative effect of the components. If Sp. P. is greater than 100, this may be due to (a) synergism in its strict sense, *i.e.*, supra-additive pharmacodynamic effect of the components, including pharmacodynamic sensitization by one component to the action of another, or to (b) activation, *i.e.*, an increase of effectiveness of the main or sole active component by other than pharmacological influences of an accompanying component. Mechanism (b) is operative if the supra-additive Sp. P. of the combination is manifested only when the combination was prepared under certain special conditions. These considerations guided the arrangement of the experiments.

(1) Monkeys supplied by Erlen, Inc., Brooklyn, N. Y.

EXPERIMENTS

1. — *The Potency Ratio Between Yellow and White Phenolphthalein*

An extensive bioassay study of the potency ratio between Y. Pht. and W. Pht. was reported previously (15). It was based upon 1801 monkey experiments with a single batch of Y. Pht. and 706 experiments with a standard batch of W. Pht., and indicated a mean potency ratio Y. Pht./W. Pht. of 2.96 and a potency $P = 296$ of Y. Pht. In these assays and in later ones based upon a large number of additional experiments, ratios established at different times and in different populations of monkeys varied generally between 2.5 and 3.0, with only a few values in a lower range. More instructive, however, than the statistical features of the mean potency ratios in these monkey populations is an analysis of the inter-individual variation of the intra-individual potency ratios. The assay method employed furnished data for such a study. In a considerable number of the 350 monkeys employed in comparative bioassays during a period of seven years, alternating experiments with varied doses of W. Pht. and Y. Pht. were conducted in numbers sufficient to obtain values with an error of less than ± 30 per cent and to calculate how much more potent Y. Pht. was in each individual monkey than W. Pht. In some monkeys employed for periods of 9 months to 6 years, this intra-individual potency ratio was determined repeatedly at various times. Characteristics of the distribution curve of all these individual potency ratios were a wide scatter, a minimum ratio of 1.0 and a maximum ratio as high as 8.0, a low peak near 3.0, modes near 1.0 and 2.5, and a large standard error. These features suggest that, whereas a marked superiority in laxative activity of Y. Pht. over W. Pht. can be demonstrated by adequate bioassay procedures, test animals differ greatly in their responsiveness to the unknown mechanism responsible for the extra-potency of Y. Pht. Some monkeys are almost three times more susceptible than the average population; others are practically refractory to the factor responsible for the increased potency.

2. — *Laxative Potency of the By-Products of Yellow Phenolphthalein and its Specific Potency*

Five substances have been identified as by-products of the synthesis of phenolphthalein and shown to be components of Y. Pht. The laxa-

TABLE I

Current No.	Substance	Component of Y. Pht. according to :	Potency referred to W. Pht. = 100	Literature data on potency
1	Fluoran	(17)(6)	< 1.3	(1)(15)
2	Isophenolphthalein	(19)	$\left\{ \begin{array}{l} < 11.6 \text{ (}^1\text{)} \\ < 1.0 \\ 2.3 \text{ (}^2\text{)} \end{array} \right\}$	(1) (7)
3	Phenolphthalin	(7)	< 6.0	(15)
4	2-(4'-hydroxybenzoyl)-benzoic acid	(7)	$\left\{ \begin{array}{l} < 6.0 \\ < 2.0 \end{array} \right\}$	(15) (7)
5	Compound of m.p. 250°	(7)	—	—
6	Yellow Extract I	—	< 20	—
7	Yellow Extract II	—	< 60	—
8	Yellow Extract III	—	< 25	—
9	Yellow Extract IV	—	< 30	—
10	Yellow Extract V (Wax Fraction)	—	< 50	—

tive potency of four of these substances was determined (see TABLE I, No 1 to 4); their potency is negligible in comparison with that of phenolphthalein. Each of them appears to amount to less than two per cent of Y. Pht. (7). The fifth impurity, which was not available in amounts sufficient for bioassay, accounts for far less than one per cent of Y. Pht. (7) and probably can be disregarded as a significant contributor to the extra-potency of Y. Pht.

Inasmuch as all the known by-products of Y. Pht. together account for only a minor part of the impurities of the commercial products, a more comprehensive procedure was chosen to determine if a compound of considerable laxative activity is among the impurities of Y. Pht., namely, ascertaining the laxative potency of so-called "yellow extracts". Such extracts contain all the by-products of Y. Pht. and can be separated without loss or chemical alteration. Extraction of Y. Pht. with ether leaves most of the phenolphthalein undissolved; extraction with ethanol results in phenolphthalein separating out by crystallization upon partial evaporation of the solvent. Four "yellow extracts" (I to IV) obtained

(¹) Modified potency statement based on experiments subsequent to those underlying previously (15) reported value.

(²) Value calculated from the same authors' (7) Median Laxative Doses.

by these two methods and one "yellow extract" of wax-like consistency (V) obtained by TSWETT column fractionation were bioassayed in monkeys (see TABLE I, N° 6 to 10). In these extracts, the by-products were enriched many-fold at the expense of the phenolphthalein content. Yet, in no case were they more potent than the starting material.

These experiments allow an estimate of the Sp. P. of Y. Pht. According to the preceding section, the mean P of Y. Pht. is 296. Since the minimum phenolphthalein content of Y. Pht. is somewhere between 93.16 and 99.46 per cent (7) and the maximum P of its by-products is less than 60 (see TABLE I, N° 6 to 10), its P_S is < 99.8 and probably even < 97.3 [equation (2)]. Accordingly the mean Sp. P. is > 285 and probably > 304 [equation 1]. In view of the great variability of the P value of Y. Pht., a value of 300 can be considered a fair estimate of the mean specific potency of Y. Pht. Since the Sp. P. is so much greater than 100, a summative effect of the components as the basis of the increased potency of Y. Pht. is excluded.

3. — *Laxative Potency of Combinations of Phenolphthalein with its By-Products*

a) *Mixtures.*

A superadditive pharmacodynamic effect due to synergism between the phenolphthalein component and a by-product of Y. Pht. will reveal itself if the two components simultaneously administered exhibit the increased potency of Y. Pht. Various "yellow extracts" and isolated by-products of Y. Pht. were mechanically admixed in powder form to W. Pht. in varied ratios. In no case was the specific potency of the mixture significantly greater than 100 (examples: TABLE II, column 5, N° 2 and 7).

b) *Co-Precipitates.*

Y. Pht. differs from a mere mechanical mixture of phenolphthalein and Y. Pht. by-products by being a co-precipitate of the components, prepared by precipitation from a common solution of the components in aqueous sodium hydroxide with the aid of mineral acid in the presence of an antioxidant. By the same procedure, co-precipitates were prepared from all the above mixtures of W. Pht. with various Y. Pht. by-products and bioassayed in the monkey (examples: TABLE II, column 8, N° 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 10; see also N° 1, a). When the co-precipitate consisted of W. Pht. and yellow extracts or of W. Pht.

TABLE II

Laxative Potency of Combinations, Prepared by Various Procedures, of U.S.P. Phenolphthalein with Various By-Products (II)

1	2	3	4	5	6	7	8
Curr. No.	II	% of II	Potency of II	Specific Potency of			
				Mechan- ical Mixture	Co-Crys- talliz- ate	Fusion Pro- duct	Co- Precipi- tate
1	Yellow Extractives (Product: Y. Pht.)	as in Y.Pht.	<60	—	126	—	a: 300 b: 270 ⁽¹⁾
2	Yellow Extract I	5	<20	117	—	—	253
3	Yellow Extract V (Wax Fraction)	1	<50	—	—	—	> 301
4	Fluoran	1	< 4.0	—	—	—	130
5	Phenolphthalin	10	< 6.0	—	—	—	150
6	Phenolphthalidein ⁽²⁾	10	—	—	—	—	139
7	Isophenolphthalein	30	<11.6	117 ⁽³⁾	—	220	180
8	"	5	"	—	—	168	160
9	"	1	"	—	—	150	—
10	Isophenolphthalein + Phenolphthalin + Phenolphthalidein	1.6 each	see above	—	—	—	208

and isophenolphthalein, the potency was always higher than that of the mechanical mixture of the same composition. In all co-precipitates with yellow extracts, the specific potency was near that of Y. Pht. (300; e.g., No 1 of Table). Fluoran, phenolphthalin and phenolphthalidein, when combined with W. Pht. by co-precipitation, increased the potency least significantly (see TABLE II, No 4 to 6).

c) Co-Crystallizates.

When the combination of phenolphthalein and yellow extract was effected by common crystallization ⁽⁴⁾ instead of by co-precipitation, for example, by evaporation of the common solvent from an alcoholic

⁽¹⁾ Co-crystallizate of column 6, redissolved in alkali and re-precipitated by diluted sulfuric acid.

⁽²⁾ A derivate, but apparently not a by-product, of phenolphthalein.

⁽³⁾ Practically the same value was recently ⁽⁷⁾ reported ($P = 67$, which indicates $91 < \text{Sp. P.} < 96$).

⁽⁴⁾ In using the terms crystallization and co-crystallization, the authors are aware that not all the components of the evaporation residue are obtained in crystalline form.

solution of the components, the dried and triturated co-crystallizate exhibited no markedly greater potency than a mere mixture of the components. Even when the common solution of yellow extract and phenolphthalein was prepared by simply dissolving Y. Pht. in ethanol, the specific potency of the co-crystallizate obtained by evaporation of the solvent was not significantly greater than 100 (TABLE II, N^o. 1, column 6). Re-precipitation, by the conventional method, of this low-potent co-crystallizate resulted in almost complete restitution of the original high potency of the Y. Pht. employed (N^o 1, *b*, column 8).

d) Fusion Products and Hot Triturations.

In some instances, fusion products of the above reported mixtures and co-precipitates were prepared by dissolving one component in the other at a temperature near the lower of the two melting points and finely triturating the product after cooling. Some of these fusion products exhibited no significantly greater potency than the mechanical mixtures, the specific potency of others, however, approached or even exceeded the greater Sp. P. of the co-precipitate (*e.g.*, TABLE II, column 7, N^o 7, 8 and 9). Fusion products of phenolphthalein and yellow extracts were not studied. The temperature required to obtain fusion is higher than that applied in the manufacture of Y. Pht. and therefore the risk of chemical alteration of some of the by-products at that temperature cannot be excluded.

DISCUSSION

This study attempts to elucidate the unknown mechanism by which commercial-grade "yellow phenolphthalein" possesses several times the laxative potency of chemically pure "white phenolphthalein". The potency difference was confirmed in this work by extending previously reported bioassay studies (15) to a total of several thousand experiments. Simultaneously, more detailed quantitative information was gathered in these experiments on the ratio of the potencies of Y. Pht. and W. Pht. The assays provide data on the variation of this "standard" value, obtained by determination of the potency ratio in different monkey populations and particularly in individual animals. Individual monkeys differ greatly in their sensitivity to the factor in Y. Pht. responsible for its superior potency; some are eight times as susceptible to Y. Pht. as to W. Pht. whereas others do not differ in their response to the two types of Pht. Certainly, any interpretation

ultimately offered for the greater potency of Y. Pht. must take into consideration this phenomenon of an extraordinary inter-individual variation in sensitivity to Y. Pht., quite unrelated to that to W. Pht. The phenomenon makes it clear that the significance of any of the reported inter-individual mean values of the Y. Pht./W. Pht. potency ratio is rather limited. Indeed the value differed for different monkey populations. The over-all mean value of 2.96 from the large population of the present study is employed with full awareness of this limitation. It cannot be claimed as a generally valid value any more than can the figure 3.3 of earlier (2), or the value 2.5 of more recent investigators (7). For the reasons here disclosed, it would be erroneous to ascribe the differences between the three values to differences in the assay methods; this should be emphasized since those who reported the value of 2.5 call their assay an "improved" method (7). Indeed, an improvement over the procedure employed in the present work has only recently been made available by one of us (16).

From the study of the conditions under which the by-products bring about the high potency exhibited by Y. Pht., a satisfactory answer was obtained to the question of a pharmacodynamic explanation of the potency increase in Y. Pht. Neither a single by-product nor the sum total of impurities of Y. Pht. was found to possess higher potency than phenolphthalein. This fact alone precludes an additive effect resulting from the summation of the potencies of the components. Moreover, the potency of the known by-products individually and in combination was found to be so negligible that pharmacological potentiation is extremely improbable. Indeed, neither single by-products nor their entirety increased the potency of pure phenolphthalein when administered simultaneously, even in form of an intimate mechanical mixture with phenolphthalein. Experiments disclosed that the mechanism becomes operative only when the components are combined under certain well-defined conditions. Whereas mechanical mixture or crystallization from a common solvent does not grant sufficiently increased potency to the resulting powder, acid precipitation of the components from their solution in alkali according to the customary method of preparing medicinal phenolphthalein results in a powder with the potency of Y. Pht. This mechanism is sharply distinguished from any pharmacodynamic mechanism of potency increase. It is a physicochemical activation.

The experiments did not clearly reveal which one of the by-products of Y. Pht. is responsible for the activation of phenolphthalein. Some of them obviously play a negligible role. The only known by-product

shown to be capable of moderately activating phenolphthalein was isophenolphthalein, but a chemically undefined, isophenolphthalein-free fraction of Y. Pht. extracts was capable of raising the potency of pure phenolphthalein to the full potency of Y. Pht. Thus, there is more than one activator among the impurities of Y. Pht. and the question how they participate in the activation of phenolphthalein awaits further investigation. It should also be mentioned that some of the by-products which may be inert, both as laxatives and as activators (compare example N^o 10, TABLE II), may play a role as "co-factors" in the undisclosed physico-chemical mechanism of activation by bringing the activators into fuller play.

SUMMARY

1) By extensive bioassay studies in rhesus monkeys it was confirmed that commercial-grade "yellow" phenolphthalein (Y. Pht.) has on the average about three times the laxative potency of U.S.P.-grade "white" phenolphthalein (W. Pht.).

2) The unknown potency-increasing mechanism is not equally operative in different monkeys; the range of individual sensitivity to the potency-increasing factor is wide and extends from high hypersusceptibility to complete refractoriness.

3) No by-product in Y. Pht. was found to possess sufficient laxative potency to account for the higher potency, and no increased potency was obtained by administering mechanical mixtures of by-products of Y. Pht. with phenolphthalein or co-crystallizates of by-products and phenolphthalein.

4) Only when the by-products and phenolphthalein were combined under certain specified conditions, preferentially by common precipitation from alkaline solution with acid, was the product found to possess the high potency of Y. Pht.

5) From these experiments it is concluded that Y. Pht. obtains its higher potency through physicochemical activation of phenolphthalein by some of its inert by-products and not by a combined pharmacodynamic action of by-products and phenolphthalein.

BIBLIOGRAPHY

1. — LOEWE, S. *J. Pharmacol. & Exper. Therap.*, 1948, 94, 288.
2. — WILLIAMS, E. F., ABRAMOWITZ, E. W. and KILLIAN, J. A. *J. Lab. & Clin. Med.*, 1934, 19, 1213.
3. — *U. S. Pat.*, 1928, 1, 681, 361.
4. — BLICKE, F. F. and WEINKAUFF, O. J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1932, 54, 1446.
5. — WHITMORE, F. C. *Organic Chemistry*. Van Nostrand 1937, p. 846.
6. — COPISAREW, M. *J. Chem. Soc.*, 1920, 117, 209.
7. — HUBACHER, M. H. and DOERNBERG, S. *J. Am. Pharm. A. (Scient. Ed.)*, 1948, 37, No. 7.
8. — *U. S. Pat.*, 1926, 1, 574, 934.
9. — FANTUS, B. and DYNIEWICZ, J. M. *Am. J. Digest. Dis.*, 1936, 2, 721.
10. — *U. S. Pat.*, 1928, 1, 693, 666.
11. — *U. S. Pat.*, 1933, 1, 894, 889.
12. — LOEWE, S. *J. Pharmacol. & Exper. Therap.*, 1939, 66, 23.
13. — LOEWE, S. *J. Am. Pharm. A. (Scient. Ed.)*, 1939, 28, 427.
14. — MATCHETT, J. R. and LOEWE, S. *J. Am. Pharm. A. (Scient. Ed.)*, 1941, 30, 130.
15. — LOEWE, S. and HUBACHER, M. M. *Arch. Internat. de pharmacodyn. et de therap.*, 1941, 65, 297.
16. — LOEWE, S. *Science*, 1947, 106, 89.
17. — BAEYER, A. v. *Ann. d. Chemie*, 1882, 212, 349.

DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY
UNIVERSITY OF UTAH COLLEGE OF MEDICINE, SALT LAKE CITY, UTAH

STUDIES ON THE LAXATIVE ACTIVITY OF TRIPHENYLMETHANE DERIVATIVES III ⁽¹⁾

Physical characteristics of phenolphthalein in relation to “ yellow phenolphthalein ” activation

BY

S. LOEWE AND IDA A. LOEWE

(Received for publication 25-2-1949).

A previous study (2) demonstrated that the excess potency of commercial-grade “ yellow ” phenolphthalein (Y. Pht.) over U.S.P.-grade “ white ” phenolphthalein (W. Pht.) is due to activation of phenolphthalein by pharmacodynamically inactive impurities of Y. Pht. and that the activation is an *in vitro* process, most likely physico-chemical in nature. These observations raise the question whether physical properties of Y. Pht. are related to its excess potency.

Quite a number of physical properties of the two customary phenolphthalein preparations have been studied by various investigators. Color, in which they differ most obviously, was found to be unrelated to activity. In the triad of physical constants,—density, melting point and solubility,—Y. Pht. differs very little from W. Pht. (3, 4). Indeed these parameters are unlikely to give any clue in the search for the mechanism of activation. The potency difference between precipitated and crystallized Y. Pht. (2) focusses attention on the physical properties of the particles of the powder preparations under study rather than on physical “ constants ” of the material. As a matter of fact, all hitherto suggested physico-chemical explanations of the potency difference between Y. Pht. and W. Pht., as enumerated previously (2), were based upon the hypothesis that smaller particle size is responsible for the greater potency of Y. Pht.

⁽¹⁾ For previous papers, see (1, 2).

In extension of this hypothesis, it has been claimed [compare (2)] that by certain procedures the particle size of pure phenolphthalein can be decreased and simultaneously the potency of the product can be raised to that of Y. Pht. Hypothesis and claim can now be put to test with the aid of bioassay of the laxative activity in the rhesus monkey (1, 2). Particle size deserves study in connection with the problem of physical activation of a drug, because particle surface area is an important factor in the rate of solution. However, another property of the particle surface, namely, its hydro-affinity, is also of interest when biological activity of poorly water-soluble powders is under consideration. Therefore, both these properties of the two types of phenolphthalein preparations were studied.

EXPERIMENTS

1. — *Particle Size and Laxative Activity of Phenolphthalein Preparations.*

In order to determine whether the activating factor in Y. Pht. is operative by changing the particle size, nine phenolphthalein preparations of different median particle diameters ⁽¹⁾ were studied for their differences in potency (see TABLE I). They included the specimens of W. Pht. (No 9) and Y. Pht. (No 1) employed in previous studies, a thymolphthalein-activated W. Pht. [No 3; for details compare (7)], and re-precipitation products prepared from these three preparations in the presence of hydrophilic "protective" colloids. Re-precipitations were performed in strict observance of a procedure claimed (6) to yield precipitates of particularly small particle size and high potency.










The data in columns 4 and 5 of Table I show that there is no consistent relationship between median particle size and potency. The median particle size of Y. Pht. (No 1) is markedly smaller than that of W. Pht. (No 9). However, the table includes instances of much greater differences in particle size, which are not paralleled by corresponding differences in potency. For example, the highly activated W. Pht. (No 3) differs but little in median particle size from U.S.P. phenolphthalein (No 9). Likewise, considerable excess potency is embodied in the activated W. Pht. No 5 in comparison with the activator-free W. Pht. No 8, whereas in both preparations the median particle size is about the same; the particles of both preparations are incomparably larger

⁽¹⁾ Measurements performed by Dr. E. J. UMBERGER.

TABLE I

Relationship between Particle Diameter and Laxative Potency of Non-activated and Activated Phenolphthalein Preparations precipitated in the Presence or Absence of Hydrophilic Colloids (G = agar; C = gum acacia; L = gelatin).

Activated preparations were either U.S.P. phenolphthalein co-precipitated with 1 % thymolphthalein (T), or yellow phenolphthalein (Y).

Current Number	Hydrophil. colloid	Hydrophob. activator	Laxative potency	Median particle diameter (μ)	Fluffiness
1	—	Y	296		188
2	G	Y	252		—
3	—	T	250		303
4	C	T	220		—
5	L	T	167		—
6	G	—	128		—
7	G	T	125		—
8	C	—	123		149
9	—	—	100		—
				0 10 20 30	

than those of any of the other preparations. Finally, the preparations No. 1 to 5 possess an average potency of 237 and an average median particle size of 9.5μ , whereas preparations No 6 to 9 possess an average potency of only 119 but no markedly greater particle size (average median: 12μ).

The presence of a protective colloid during the process of reprecipitation did not decrease but invariably increased particle size; the median particle diameter is greater in No 2, in No 8 and in No 4, 5 and 7 than in the respective "non-protected" preparations No 1, 9 and 3. Nor did the addition of colloid result in increased potency. In the case of Y. Pht., and also of otherwise activated phenolphthalein, the colloids decreased or even abolished (No 7) the excess potency, but out of proportion to the increased particle size. In non-activated W. Pht., the colloids caused no further decrease in potency; the potency increase recorded is always without mathematical significance and at the most only $1/7$ of that exhibited by Y. Pht.

The great majority of the particles of the colloid-protected preparations were large globules of complex structure; they can be resolved optically into a great number of elementary crystalline particles which are embedded in an amorphous mass and are smaller than the average particle of W. Pht. The estimate of median particle diameter in these preparations relies largely on such complex formations, whereas that in preparations devoid of protective colloid is based predominantly on elementary particles. These optical details may justify the claim that colloid-protection decreases particle size. However, they put even more emphasis on the lack of relation of potency to particle fineness, since none of these preparations exhibited significantly increased laxative potency and those derived from Y. Pht. exhibited even decreased potency. It is true that the elementary phenolphthalein particles in all these preparations appear to be surrounded by a coat of colloid, which may decrease the process of solution in the surrounding aqueous phase by decreasing the rate of diffusion. This consideration is, however, not applicable to gelatin-protected preparations, such as No 6 and the colloidal phenolphthalein of FANTUS and DYNIEWICZ (5), which lose their coating by digestion in the upper intestinal tract; yet these preparations displayed decreased or only inadequately increased activity in the lower intestine.

In some instances the fluffiness of the products was used as an additional measure of particle fineness. Fluffiness was expressed by the volume which 100 gm. of the powder occupied in a graduated cylinder after a period of shaking under uniform conditions. As indicated in Table I (column 6), potency was no more proportional to fluffiness than it was reciprocal to the median particle size.

2. — *Surface Hydro-affinity and Activity of Phenolphthalein Powders.*

The question if there is any difference between the surfaces of Y. Pht. and W. Pht. particles is answered by the following experiment: A small amount of Y. Pht. was spread on the fluid surface of a water-filled beaker, and a similar amount of W. Pht. on that of another beaker. The W. Pht. sedimented within a short time, whereas the Y. Pht. powder kept afloat for a long period. Since the specific gravity of both forms of phenolphthalein is virtually the same and in both cases > 1.0 (3, 4), the experiment suggests that Y. Pht. is water-repellent, whereas W. Pht. is readily wettable. For the crucial test, the powders were spread on surfaces of water containing varied concentrations of a wetting agent. Cetyl pyridinium chloride ("Fixanol") was employed in all repellency tests of this study after experiments with numerous

TABLE II

*Relationship between Sedimentation
Rate and Laxative Potency of Phenolphthalein Preparations*

	Sample 1 W. Pht.	Sample 2 Y. Pht.	Sample 3 Activated Phth. ⁽¹⁾
1. Total weight of sample (gm)	1.0000	1.0000	1.0000
Amount sedimented (gm)	0.2007	0.0632	0.0734
2. $\frac{\text{W. Pht. sediment}}{\text{Sample sediment}}$	1.00	3.17	2.74
3. $\frac{\text{Laxative potency of sample}}{\text{Laxative potency of W. Pht.}}$	1.00	2.96	2.42
4. (line 2) : (line 3)	1.00	1.08	1.13

other anionic and cationic wetting agents gave essentially the same results. Indeed, Y. Pht. was also caused to sediment, either in a sufficiently high concentration of wetting agent, or even in pure water after a sufficiently long period of exposure which can be much shortened by stirring.

Three procedures were used for comparing the water repellency of the phenolphthalein preparations pertinent to this study.

1) Gravimetric measurement of the amounts sedimented after a predetermined time. A representative experiment of this type is shown in Table II. One gm. of each of two test preparations, W. Pht. and Y. Pht., was spread on the surface of 150 cc water contained in a separatory funnel; after one minute of stirring, 100 cc of the funnel content, containing all the sedimented powder, were drawn off from the bottom and filtered, and the residue was dried and weighed. All experimental conditions were strictly identical in the parallel experiments. The results confirm those of the qualitative comparisons. The experiment tabulated included a third preparation, the thymolphthalein-activated W. Pht. mentioned in the preceding section. More or less accidentally, the ratios between the sediments were reciprocally proportional to the potency ratios.

2) Determination of the sedimentation time in varied concentrations of wetting agent. Beakers of equal diameter were filled with equal amounts of solutions containing arithmetically increasing Fixanol

⁽¹⁾ W. Pht. co-precipitated with 0.5 per cent thymolphthalein.

concentrations. Equal amounts of the test preparations were deposited on the surfaces of these solutions and the time (t) required for complete sedimentation in the concentration (c) of the wetting agent was determined. Figure 1 presents the c/t curves of W. and Y. Pht.; the curves were smoothed from data obtained in repeated independent experiments. In concentrations between 1.3 and 3 mgm% of the wetting agent, the sedimentation time of Y. Pht. is about 10 times that of W. Pht.; at lower concentrations the difference in sedimentation time is still greater.

3) Determination of threshold concentration of wetting agent required for sedimentation. Fixanol solutions were placed in 50 cc beakers of 4 cm diameter. The test powder was spread upon the fluid surface from a glass spoon holding 5 mgm, and the minimum concentration of wetting agent necessary to cause an estimated 90 per cent of the powder to sediment in 30 minutes was determined.

An estimate of repellency may be obtained from the number of mg of Fixanol contained in 100 cc of the Fixanol solution complying with the above described end-point. This simplified procedure is suitable for routine estimations of the repellency of powders, if its limitations are duly taken into account. Values for threshold

wetting concentration are not reliably reproducible. Rate of wetting varies not only with the area upon which the powder is spread and the amount of powder applied, but also with details of the spreading procedure such as height of fall of the particles from the spoon to the surface and their distribution over the area, with the age and history of the fluid surface, including the period of its exposure to the air and the nature of airborne impurities, and with the previous age and history

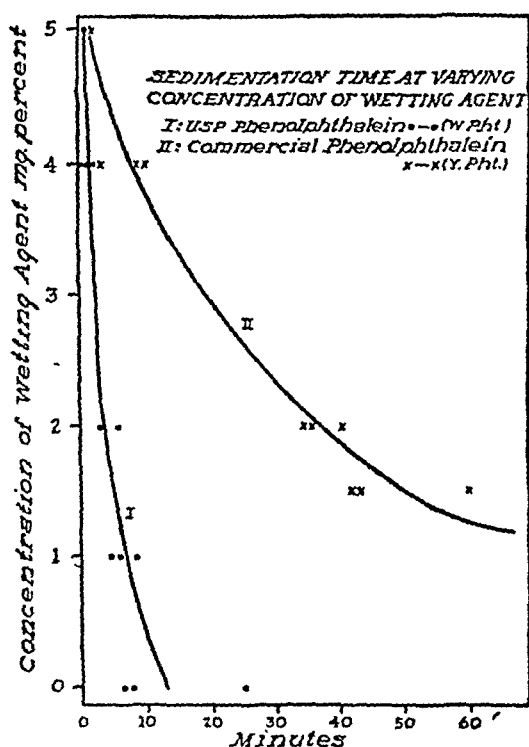


FIG. 1

Relationship between Concentration of Wetting Agent and Sedimentation Time. Curves present the interval (in minutes; abscissa) from the moment of spreading of powder (I = pure, II = yellow phenolphthalein) on surface of wetting solutions of varied concentration (ordinate) to the moment when 90 % of the powder has settled at the bottom.

of the wetting solution,—to mention only some of the well-known factors influencing reproducibility of surface experiments. Therefore, only simultaneously performed parallel experiments were considered conclusive.

With the aid of these three methods it was possible to examine the water-repellency of numerous preparations of W. Pht. and Y. Pht. of different origin, obtained from different manufacturers and by different procedures of reprecipitation, and to compare their water-repellency with their laxative potency in the monkey. In all instances, Y. Pht. exhibited greater water-repellency than W. Pht. and the repellency differences were about the same as those of the two specimens underlying the presentation in Figure 1. The only exceptions were re-crystallized Y. Pht. preparations and Y. Pht. preparations re-precipitated in the presence of protective hydrophilic colloids (see preceding section), all of which lacked the high laxative potency regularly found in commercial or conventionally re-precipitated Y. Pht.

DISCUSSION

In the search for physical characteristics which might help elucidate the presumably physical mechanism responsible for the activation of phenolphthalein in its impure commercial-grade form (Y. Pht.), Y. Pht. was found to differ from the pure U. S. P.-grade W. Pht. in two physical properties, namely, by exhibiting smaller median particle diameter and greater water-repellency. Which of these two physical properties offers the clue to the mechanism of activation of Y. Pht.?

Smaller particle size, if correlated with greater potency, would immediately point to a mechanism of enhanced solution in the aqueous biological environment as the responsible factor. Rate of solution is proportional to surface area, and the specific surface area grows reciprocally to the radius when the material is divided into spherical particles. Indeed, the particle diameter of Y. Pht. is about $1/3$, and its potency about three times, that of W. Pht. This would be compatible with the conclusion that Y. Pht. owes its greater potency to smaller particle size, increased surface area and consequently greater rate of solution in water. However, such a conclusion is opposed by a variety of considerations.

1) The present study discloses that there is no consistent correlation between median particle diameter and laxative potency in quite a number of phenolphthalein preparations.

2) Colloidal phenolphthalein, a preparation of FANTUS and DYNIEWICZ having a much smaller particle diameter than Y. Pht. and 10 times the "solubility" (*i. e.*, rate of solution) of W. Pht., was "probably not more than twice as active" as W. Pht. (5).

3) The colloid-protected preparations used in the present study can also be taken as examples that a decrease in particle size does not increase potency; that they are composed of small elementary particles has been discussed above.

4) Y. Pht. and W. Pht. do not differ in solubility (3, 4). This statement originates from a careful study in which differences in rate of solution would also have been detected.

5) Increased rate of solution in water, the major factor that would be instrumental in a potency increase due to smaller particle size, is counteracted by water-repellency, the second property distinguishing Y. Pht. from W. Pht. This property of the particle surface indicates that the particles resist forming a common interface with the aqueous solvent and tend to maintain the air coating which they carry when ingested, and that a repellent phenolphthalein is certainly less prone than the readily wettable form to dissolve in an aqueous environment.

All these considerations oppose the assumption of a correlation between potency of phenolphthalein preparations and their solubility, or solution rate, in an aqueous solvent. Rather, phenolphthalein provides another example that the process of solution of a drug in its aqueous environment is not an indispensable prerequisite for its transfer to the site of action and that its water-solubility is not a decisive factor in this transfer.

The failure of the difference in particle size to give a clue to the mechanism of activation of Y. Pht. reverts attention to the other property in which W. and Y. Pht. were found to differ. The data presented herein indicate that all Y. Phts. exhibiting the full excess activity inherent in the commercial preparation differ from W. Pht. by decreased hydro-affinity of their particle surface, whereas even maximally decreased particle size of W. Pht. does not grant such a degree of excess potency. However, more data are required in order to exclude the possibility that repellency is merely coincident with activation but not involved in the mechanism of activation. Such data will be reported in a subsequent paper (7).

SUMMARY

1) In the search for physical properties of phenolphthalein which may serve to explain the mechanism of activation of "yellow phenolphthalein" responsible for its laxative superiority to pure "white phenolphthalein", two properties of the powder particles were found in which the two forms differ, namely, median diameter and surface hydro-affinity.

2) The median particle diameter of Y. Pht. is smaller than that of W. Pht.

3) The particles of W. Pht. are readily wettable whereas those of Y. Pht. are water-repellent.

4) Precipitation of W. Pht. in the presence of hydrophilic protective colloids, a procedure claimed to yield products of smaller size and greater laxative activity, was found to decrease the potency of Y. Pht. and not to increase that of W. Pht. The products were found to be precipitated in large diphasic globules containing elementary phenolphthalein particles of decreased size.

5) Neither particle fineness nor increased surface area was found to be responsible for the increased laxative potency exhibited by Y. Pht.

6) The relationship between water-repellency and activation requires further investigation.

BIBLIOGRAPHY

1. — LOEWE, S. *J. Pharmacol. & Therap.*, 1948, 94, 288.
2. — LOEWE, S., and LOEWE, IDA A. *Arch. internat. de pharmacodyn. et de therap.*, 1949, 80, 236.
3. — HUBACHER, M. A. and DOERNBERG, S. *J. Am. Pharm. A. (Scient. Ed.)*, 1948, 37, 261.
4. — HUBACHER, M. H. *Ibidem*, 1945, 34, 76.
5. — FANTUS, B. and DYNIEWICZ, J. M. *Am. J. Digest. Dis.*, 1935, 2, 721.
6. — *U. S. Pat.*, 1933, 1, 894, 889.
7. — LOEWE, S. and LOEWE, IDA A. *Arch. internat. de pharmacodyn. et de therap.*, 1949, 80, 246.

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, UNIVERSITY OF ISTANBUL

THE EFFECT OF GLUCOSE INJECTIONS ON THE BLOOD SUGAR LEVEL, ALKALI RESERVE, AND BLOOD- AND URINE pH VALUES OF STARVED RABBITS

BY

KÂMURAN ERÖZ AND MELIHA TERZIOĞLU

(Received for publication 5-3-1949).

The relation between hyperglycemia and acid-base equilibrium of blood is regarded to be of interest from several points of view; such as, physiologic state of hunger, intermediary carbohydrate metabolism in physiological and pathological states as diabetes, as well as, narcosis and surgical shock. Since the literature concerning this subject has been adequately reviewed by MARKEES and MENCZER (1946), it will suffice here to go into it only as far as it concerns the narrow scope of this paper.

A few years ago, one of us (TERZIOĞLU, 1945) observed a large production of red blood corpuscles and hemoglobin in rabbits that were fed on the acid diet of oats. That this diet produces an acidosis in rabbits, as characterized by a drop in urine pH and alkali reserve, had previously been demonstrated by KURIYAMA (1918) and BECKMANN (1922). In our experiments also, we noted a very large drop in urine pH , from the normal of around 8.9 to 4.2, during the first week or so on the acid diet. This early period was termed by us as the "minimum- pH phase." However, subsequent to this initial lowering, the pH of urine varied between 7-8.5 for the remainder of the experimental period and was thus designated as the "adaptation-phase". The "minimum- pH phase" was most probably of dietary origin, while the succeeding period was attributed to possible migration of alkaline substances from the tissues into the blood stream.

Using the urine pH changes as an index of the alterations in acid-base equilibrium of blood, we attributed the regeneration of blood, as observed under our experimental conditions, to the stimulation of bone

marrow by the increase of H-ions in blood stream; an interpretation analogous to that of WINTERSTEIN for the stimulation of the respiratory center. In view of these earlier results, we investigated the effect on blood regeneration in rabbits of glucose acidosis, such as had been induced by MARKEES and MENCZER (1946). The results of these experiments are separately reported in this journal (TERZIOĞLU, 1949).

MARKEES and MENCZER (1946) investigated the effect of injections of glucose, or of glucose supplemented by the administration of organic acids, upon the alkali reserve of rabbits. Since their results dealing with injections of glucose plus organic acids do not concern us here, we will limit ourselves to a discussion of their experiments with glucose solutions only. They injected starved rabbits with 50 % glucose solution, in doses containing 2 grams of glucose per kilo of body weight, delivered twice at a 2-hourly interval. The alkali reserve was determined before and at various intervals, ranging from 60 to 345 minutes, after the injection of glucose solution. In all cases they found a decrease in alkali reserve which, however, was highly variable, differing from the pre-injection starvation values by 1.9 to 30 vols % CO_2 . According to these authors, the intermediary products of glucose breakdown, such as, pyruvic and acetic acids, are bound by alkali reserve, thus bringing about a reduction in its value. Thus, if pyruvic and acetic acids in moderate doses are administered orally to starved or "glucose-loaded" rabbits, there is a distinct fall in alkali reserve, accompanied by a pronounced hyperglycemia. On the other hand, the administration of lactic acid even in high doses produces only a mild hyperglycemia and a very small reduction in alkali reserve. Furthermore, the increase in pyruvic acid of blood following glucose administration has been proved by BUEDING et al. (1942) in dogs and by KLEIN (1942) in normal men.

That subcutaneous or intravenous administration of glucose solutions brings about a decrease in alkali reserve as well as a reduction in urine pH had previously been noted by WYMER (1926) in 3 rabbits. For injections, he used a physiological glucose solution (equimolar glucose in physiological salt solution) and noted that even after 24 hours the urine was still acid. However, on injection of the same solution to normal men, no change in alkali reserve was observed while the urine was found to be alkaline. On the other hand, CAMPBELL and MALTBY (1928) obtained a reduction in alkali reserve in man upon the administration of levulose. Both workers attributed the alkali reserve lowering effect of these monosaccharides to their breakdown into lactic acid, which when injected in high concentrations is not rapidly used up but is bound with the alkali.

Thus it is evident that whether it is lactic acid or pyruvic and acetic acids which cause the acidosis subsequent to glucose administration, the decrease in alkali reserve is brought about by an increase in the intermediary acid products of glucose metabolism. Therefore, for our purposes this type of physiological acidosis seemed to be a suitable one for further search into the regeneration of blood as brought about by the effect of H-ions on the bone marrow.

The purpose of the present article was to investigate the effect of the concentration of glucose solution and its dosages employed by us in our regeneration experiments, on the extent and duration of change in alkali reserve, as well as, on the blood sugar level, urine and blood pH values.

MATERIAL AND METHODS

The 17 rabbits used for these experiments were of 1950 to 2800 grams in body weight and had been raised on the standard laboratory diet of vegetables and wheat bran. They were placed in separate metabolism cages for collection of urine and were starved for 15 to 24 hours prior to experimentation, as well as, throughout the course of the experimental period. Six of the rabbits (nos. 2 to 7) were experimented upon twice, once as a control without the injection of glucose and a few weeks later following the glucose administration, thus offering a better basis for comparison.

The sequence of experimentation was as follows: About 4-5 ml of blood was withdrawn from the ventricle of the animal, laid and fixed on the operating board in a supine position; most of the blood in the syringe was immediately emptied into a centrifuge tube containing a very slight amount of liquid in powder form while the remainder was placed in a second tube to be used for blood sugar determinations. In the experiments where blood pH was also determined, the hydrogen electrode was previously filled to nearly half with isotonic-salt solution and hydrogen, and the necessary amount of blood was emptied into the electrode and mixed with the solution therein. The animal was then injected subcutaneously with 25 or 50 % glucose solution, in doses containing 2 grams of glucose per kilo of body weight, and the blood withdrawal was repeated at the intervals indicated in tables I and II.

The strength of the sterile glucose solution mostly employed by us was half of that used by MARKEES and MENCZER, though the dose of glucose administered in a single injection was the same. The reason for the preference of a more dilute solution was to overcome, or at

TABLE I

The results on control and experimental rabbits of March-May series, injected with 25 % or 50 % glucose solutions in doses containing 2 grams of glucose per kilo of body weight

Animal no.	Experimental conditions	Blood sugar (mg %)	Alkali reserve (vols % CO ₂)	Urine pH
1	Starved for 24 hrs. Glucose (50 %), 3 hrs. 5 hrs.	100	48.4	8.68
		170	44.5	
		105	46	7.31
2	Starved for 24 hrs. Glucose (50 %), 2 hrs. 4 hrs.	110	47.4	8.85
		193	46.9	
		213	43.2	
2 C	Starved for 15 hrs. 3 hrs. 6 hrs. 24 hrs.	104	51	8.44
		108	50.4	
		124	48	
		104	48	
3	Starved for 15 hrs. Glucose (50 %), 4 hrs. 24 hrs.	93	57	8.92
		170	48.7	8.71
		92	52.4	7.75
3 C	Starved for 15 hrs. 3 hrs. 6 hrs. 24 hrs.	96	55.5	
		97	55.5	
		96	52	
		110	54	
4	Starved for 15 hrs. Glucose (25 %), 3 hrs. 6 hrs. 24 hrs.	105	56	8.89
		140	50.8	
		162	44	
		105	51.6	8.89 (1)
4 C	Starved for 15 hrs. 3 hrs. 6 hrs. 24 hrs.	121	53	8.45
		121	53	
		124	52.7	
		121	53	7.13
5	Starved for 15 hrs. Glucose (25 %), 4 hrs. 6 hrs.	106	53	
		153	43.5	
		136	46	
5 C	Starved for 24 hrs. 3 hrs. 6 hrs.	109	56	8.8
		137	49	8.66
		105	55	8.52
6	Starved for 15 hrs. Glucose (25 %), 3 hrs. 6 hrs. 24 hrs.	105	55	8.73
		145	55	
		115	51	
		105	56	6.7

(1) Urinated shortly after feeding.

TABLE I (continued)

Animal no.	Experimental conditions	Blood sugar (mg %)	Alkali reserve (vols % CO ₂)	Urine pH
8 C	Starved for 24 hrs.	130	51	9.02
	3 hrs.	130	55	
	6 hrs.	127	50.5	
9 C	Starved for 24 hrs.	136	55	8.54
	3 hrs.	131	54.5	8.73
	6 hrs.	129	55	
10 C	Starved for 24 hrs.	129	42.5	8.66
	3 hrs.	133	42	
	6 hrs.	124	48	
	24 hrs.	133	43	

least to reduce, the irritating effect on the subcutaneous tissues of a strong hypertonic solution in our long-term regeneration experiments. However, in a few experiments we employed a 50 % glucose solution to see whether a more concentrated solution would have any different effect on the lowering of alkali reserve. Since for a long period of four weeks in our regeneration experiments we delivered daily injections of the above dose of glucose, it was also necessary to determine the duration of glucose acidosis. For this reason, in some of the animals we made determinations on blood samples obtained for as long as 24 hours after the glucose injections.

Since some of the control rabbits in our regeneration series were injected with an equimolar sucrose solution (47.5 %) in an amount equivalent to the volume of glucose solution administered to experimental animals, in the present experiments we sought the effect of this disaccharide on the alkali reserve of two rabbits.

The *alkali reserve* of plasma was determined by the Van Slyke manometric method, using 1 ml of plasma, on two samples of the same blood. The difference between the two determinations did not exceed 0.5 to 1 vols % CO₂. For the saturation of plasma with CO₂, Van Slyke advises alveolar air or 5.5 % CO₂-air mixture obtained from a tank. We employed for the same purpose an apparatus especially devised by VAN SLYKE, WU, and MCLEAN (1923) for delivering a known quantity of gas into a tonometer by means of pressure read on a manometer (cited in PETERS and VAN SLYKE, 1932). Thus in our experiments, the partly evacuated system, including the tonometer, was filled with 40 mm

of CO_2 pressure, and air was then admitted until the pressure was raised to atmospheric. The tonometer then containing approximately 5.5 % CO_2 -air mixture was rotated for nearly five minutes by an automatic rotator to insure complete saturation of plasma with CO_2 .

The blood sugar level was determined also on two samples by the HAGEDORN-JENSEN method. For the detection of sugar in urine Benedict's qualitative test was used.

Blood and urine pH values were determined electrometrically by the hydrogen electrode. In order to decide whether repeated blood withdrawal caused hemoconcentration, the serum refractory index was estimated by the Pulfrich refractometer.

RESULTS

In 9 out of 11 rabbits injected with 2 grams of glucose per kilo of body weight out of a 25 % glucose solution, there was a lowering of alkali reserve, varying between 3.5 to 12 vols % CO_2 in range, within 3 to 6 hours following the glucose injection (TABLES I-II). Accompanying this fall in alkali reserve was a pronounced hyperglycemia, whose highest peak in the majority of animals, coincided with the lowest alkali reserve value. The two exceptions were nos. 6 and 14. In rabbit no. 6 (TABLE I), 3 hours after the glucose injection, the alkali reserve value showed no change while the blood sugar level was at its highest peak; 6 hours later, however, the blood sugar level returned to practically normal, by which time the alkali reserve had reached its lowest limit.

The drop in alkali reserve and the extent of hyperglycemia of the three rabbits (nos. 1-3, TABLE I) injected with 50 % glucose solution were not any different from those injected with a solution of half the strength, since the dosage of glucose administered in both cases was the same.

In order to determine the duration of acidosis, determinations were made at 24 hours after the glucose administration in five of the rabbits (nos. 3, 4, 6, 7, 14). It was found that in 3 rabbits acidosis still persisted while the blood sugar level was normal. In no. 6 (TABLE I) both alkali reserve and blood sugar values had returned to normal while in no. 7 (TABLE II) alkali reserve was largely increased, the difference from the initial value being 9 vols % CO_2 .

The two rabbits which responded to glucose injections with an increase in alkali reserve were nos. 12 and 15 (TABLE II). This is especially

TABLE II

The results on control and experimental rabbits of July series, injected with 25 % glucose solution in doses containing 2 grams of glucose per kilo of body weight, and on the two rabbits injected with 47.5 % sucrose solution (4 ml per kilo of body weight)

Animal no.	Experimental conditions	Blood sugar (mg %)	Alkali reserve (vols % CO ₂)	Blood pH	Urine pH
6 C	Starved for 15 hrs.	100	63.55	7.43	8.43
	3 hrs.	101	51.5	7.50	
	7 hrs.	102	53	7.53	
	24 hrs.	100	52.6	7.48	
7	Starved for 15 hrs.	101	32.6	7.28	8.47
	Glucose (25 %), 3 hrs.	122	30.1	7.25	
	6 hrs.	156	25.8	6.91	
	24 hrs.	100	41.6	7.44	
7 C	Starved for 15 hrs.	120	28.5	7.04	8.33
	3 hrs.	150	33.4	7.10	
	6 hrs.	133	35	7.26	
	24 hrs.	122	35.3	7.17	
11 C	Starved for 15 hrs.	106	23.7	7.15	7.95
	3 hrs.	103	30.7	7.23	
	6 hrs.	102	30	7.23	
	24 hrs.	105	25.7	7.18	
12	Starved for 15 hrs.	125	22.7	7.15	
	Glucose (25 %), 3 hrs.	150	32	7.30	
	6 hrs.	263	32.4	7.19	
13	Starved for 15 hrs.	115	42.5	7.24	8.01
	Glucose (25 %), 3 hrs.	130	39	7.04	
	6 hrs.	116	39	7.16	
14	Starved for 15 hrs.	125	36.5	7.39	
	Glucose (25 %), 3 hrs.	138	34.6	7.41	
	6 hrs.	183	33.5	7.41	
	24 hrs.	120	32.7		
15	Starved for 15 hrs.		26.2	7.11	7.91
	Glucose (25 %), 3 hrs.		29.3	7.30	
	6 hrs.		30.3	7.37	7.80
16	Starved for 14 hrs.		52.9		
	Sucrose(47.5%), 2 hrs.		52.9		
	4 1/2 hrs.		59.7		
	6 1/2 hrs.		52.3		
17	Starved for 15 hrs.		47.0		
	Sucrose(47.5%), 2 hrs.		54.5		
	4 hrs.		51.9		
	6 1/2 hrs.		55.7		

surprising in the case of no. 12, since its blood sugar level 6 hours after injection was over twice that of the pre-injection value (TABLE II). Moreover these two animals, as well as nos. 13 and 14 (TABLE II) in which the fall in alkali reserve was only around 3.5 vols % CO_2 , were experimented upon during the very hot month of July. The great variability in our regeneration experiments also carried on during this period offer an interesting corollary to these results and will be later discussed.

With the exception of one rabbit (no. 6), no trace of sugar was detected in urine of animals injected with glucose. The amount of sugar in the 24-hour urine sample of no. 6 corresponded approximately to 0.5-1 gram per liter, as estimated by the Benedict qualitative test.

Of the 10 control rabbits, four (2 C, 3 C, 5 C, 6 C) responded with a decrease in alkali reserve, varying in range from 3-6 vols % CO_2 , four (7 C, 8 C, 10 C, 11 C) with an increase, of 4-6.5 vols % CO_2 in range, while the remaining two (4 C, 9 C) showed no deviation from the initial values. A slight hyperglycemia accompanied the drop in alkali reserve observed in rabbits 2 C and 5 C (TABLE I) and may have been of excitatory origin; but inspite of the finding that the blood sugar level of rabbit no. 6 was most constant, its alkali reserve values showed a very large deviation from initial, lasting for as long as 24 hours after the injection. We are unable to explain this finding and very hesitatingly attribute it to probable technical error in the determination of the initial value.

Though the increase in alkali reserve of the four control rabbits varied between 4-6.5 vols % CO_2 in range, the blood sugar level of all but one was practically the same as the initial values (TABLES I and II). The considerable hyperglycemia of rabbit 7 C (TABLE II) may have been brought about by excitation on blood withdrawal.

The two rabbits injected with sucrose both responded with an increase in alkali reserve, 2 to 4.5 hours after the injection (TABLE II). Six and a half hours later alkali reserve returned to normal in one (no. 16) while was still further augmented in the second (no. 17).

Although urine pH would be a further index of the onset and progress of acidosis, it was considered wise not to try to obtain urine by catheterization from these animals, since in due excitement both the blood sugar and alkali reserve values might be altered. We therefore had to wait until they urinated. Since they were exempted from food and since their body water was lowered by repeated blood withdrawal, they sometimes did not urinate until a few hours after food was offered. Unless they urinated within the starvation period, urine was discarded,

and for this reason, no values for urine pH during the experimental period are given for some of the animals. Of the five rabbits whose urine could be collected, urine pH was distinctly lowered in nos. 1, 3, and 6 (TABLE I), and was unaltered in nos. 4 (TABLE I) and 15 (TABLE II). Although the second urine sample of no. 4 was collected shortly after feeding, one may still doubt as to whether it may include any of the alkaline substances introduced by food.

Of the four controls urine pH was unchanged in three (5 C, 6 C, 9 C) while in no. 4 it was very much lowered. This is a curious finding since the same animals which previously had been injected with glucose showed no alteration in urine pH (see no. 4, TABLE I). Furthermore it cannot very well be attributed to acidosis of hunger, since the alkaline reserve values of this animal are most regularly constant.

The blood pH was determined only in animals that were experimented upon during the month of July, when the decrease in alkali reserve was either not as marked as in the previously experimented rabbits or was most irregular. Of these five, the blood pH was very much lowered in no. 7, from 7.28 to 6.9, during 6 hours, at which time the drop in alkali reserve was similarly marked. Twenty-four hours following the glucose injection, the values for both alkali reserve and pH rose to far above the initial figures (TABLE II). Beside this one animal, both the alkali reserve and blood pH were diminished in no. 13 (TABLE II), as a result of glucose injections. Of the remaining three rabbits, there was an increase in blood pH accompanied by an augmentation in alkali reserve in rabbits 12 and 15, while in rabbit 14, the pH staid nearly the same, the alkali reserve being decreased by only about 3 vols % CO_2 during the six hours following the glucose injection. Although the number of experimental animals is too few to warrant a definite conclusion, the results indicate that the acidosis so produced may be of an uncompensated type.

Of the three control rabbits in which the blood pH was also measured, both the blood pH and the alkali reserve were augmented in nos. 7 C and 11 C (TABLE II). In no. 6, however, the blood pH varied very insignificantly while the alkali reserve was greatly diminished. This finding may be of a confirmatory nature for our afore-mentioned doubt that the high initial value for alkali reserve of this rabbit may possibly be due to an error in the determination.

The values for serum refractory index in both the control and the experimental animals were too variable to render a definite conclusion. In some, blood became more dilute and in others more concentrated

as blood was withdrawn at the indicated intervals. For this reason these values for the serum refractory index are not included in the tables.

DISCUSSION

The results of these experiments indicate that injections of a 25% glucose solution, in doses containing 2 grams of glucose per kilo of body weight, to starved rabbits bring about a lowering of alkali reserve, whose lowest level generally corresponds to the highest peak of hyperglycemia. It was found further that in some animals this drop in alkali reserve persisted for as long as 24 hours after the glucose injections. The results on the whole confirm those of MARKEES and MENCZER (1946), who investigated the effect of glucose injections on alkali reserve only. The extent of its diminution was broader in their than in our series of experiments. This could be expected since they administered two consecutive injections of the same dose as employed by us. In spite of this, however, the range of variation in the decrease of their alkali reserve values was more extensive than in ours, being 1.9 to 33 vols % CO_2 , as compared with 3.5 to 12 vols % CO_2 of our results.

Unfortunately the alterations in urine pH could not be investigated in all of the rabbits, due to their abstinence from urination during the experimental period of starvation when body water may have been decreased by repeated blood withdrawal. However, the simultaneous determinations of serum refractory indices did not render any clue as to the change in body water, since blood appeared to be diluted in some rabbits while concentrated in others.

In three out of four animals in which the alkali reserve was reduced urine pH was also lowered, but no such parallelism could be established for the fourth (no. 4, TABLE I). Since the urine of the latter animal was collected shortly after feeding, some doubt is raised as to whether it may include any of the alkaline substances present in the food ingested. Thus the results on these few animals indicate that glucose injections not only lower the alkali reserve but also bring about a change in the reaction of urine towards acidity. This finding is in accord with that of WYMER (1926) who on the administration of a physiological glucose solution to three rabbits, similarly observed a reduction in both the alkali reserve and the urine pH values. In our long-term regeneration experiments, we found no change in urine pH as a result of daily injections of the same concentration of glucose solution. At first sight, this might seem to be in contradiction to results in the present experi-

ments; but when one considers that the experimental conditions in the two series are not really comparable on account of feeding in the regeneration series, this discrepancy may well be overruled. Upon the introduction of alkali-rich food, such as vegetables, into the organism, alkaline substances may enter into the composition of urine thus raising its reaction towards alkalinity.

The changes in acid-base equilibrium of blood as a result of glucose or levulose injections have been attributed by various workers to the accumulation in blood of various organic acids, that are the intermediary breakdown-products of these carbohydrates. For example, MARKEES and MENCZER (1946) attribute it to the presence of pyruvic and acetic acids while WYMER (1926) and CAMPBELL and MALTBY (1928) believe that the breakdown of glucose or levulose, respectively, to lactic acid is the real cause of acidosis so brought about. Although we are inclined to accept the explanation of MARKEES and MENCZER (1946) in regard to the underlying cause of glucose acidosis, we nevertheless believe that further experimentation along this line is necessary.

The blood pH also investigated in a few glucose-injected animals generally revealed a diminution, accompanying the fall in alkali reserve values. This finding demonstrates that glucose acidosis is most probably of an uncompensated type.

The results of our experiments carried on during the hot month of July are highly variable and inconsistent. The alkali reserve and blood pH values are either very little decreased or even increased as a result of glucose injections. This finding is of utmost importance to the explanation of our regeneration series carried on during the same hot summer days, when unlike the previous experimental animals, the rabbits injected with glucose failed to respond with an augmentation in blood volume and erythrocytes. If the regeneration of blood under these conditions is to be attributed to an increase in H -ions, then this discrepancy between our July regeneration series and those carried on during other seasons can be explained by the difference in glucose metabolism in the two sets of experimental animals. The excessively high environmental temperature may have so lowered the metabolic state of the animal, that the injected glucose may be directly converted into glycogen, instead of its breakdown into intermediary acid products as in the other series of animals.

Our results on control animals demonstrate that on the whole alkali reserve values of rabbits are very unstable; since under starvation, equal numbers reacted to blood withdrawal by either increase or decrease, while in only two out of ten animals, was there no variation from the initial

values. This can be attributed to constitutional differences, since all other conditions were alike. The blood pH of controls as of that of glucose-injected rabbits seemed to vary in the same direction as the alkali reserve. The fact that with small variations in alkali reserve blood pH is also altered, proves that the buffering capacity of rabbit's blood is rather weak and is unable to overcome even small changes in acid-base equilibrium.

The normal or initial alkali reserve values of rabbits in the series vary from 22.7 to 63.5 vols % CO₂, the majority lying between 50-60 vols % CO₂. This high variability in the normal range has also been noted by other workers in literature. Thus ZUNZ and CRASCINESCU (1938) noted that alkali reserve of normal rabbits varied between 39.5 and 57.5 vols % CO₂, and according to MARKEES and MENCZER (1946), it varies between 21.72 and 54.88 vols % CO₂, the majority lying within a range of 35-45 vols % CO₂.

Injections of an equimolar sucrose solution to two rabbits raised the alkali reserve of blood. Our experiments dealing with the fate of this carbohydrate in the organism have substantiated those of others in that the greatest amount of the injected sucrose is excreted in urine (TERZIOĞLU and ERÖZ : this journal). Since the blood glucose level did not alter appreciably as a result of sucrose injections (TERZIOĞLU and ERÖZ : this journal) and since no decrease in alkali reserve has been observed in the present experiments, it is unlikely that the remaining sucrose is split into glucose and may possibly be conserved in tissue fluids, such as has been postulated for the dog by POWER and KEITH (1936).

SUMMARY

1) Injections of a 25 % or a 50 % glucose solution, in doses containing 2 grams of glucose per kilo of body weight, to starved rabbits brought about a reduction in alkali reserve, varying between 3.5 to 12 vols % CO₂ in range. This diminution of alkali reserve was accompanied by hyperglycemia whose highest peak generally corresponded with the lowest alkali reserve value. In some of the animals, the alkali reserve values remained at a low level 24 hours after the glucose injection, though the blood sugar level was, by that time, reduced to the pre-injection value.

2) In three out of four animals in which the urine reaction was also investigated, the decrease in alkali reserve values was accompanied by a lowering of the urine pH.

3) The simultaneous reduction of alkali reserve and blood pH values in some of the glucose-injected rabbits revealed that the acidosis so brought about may be of an uncompensated type.

4) The data on the alkali reserve and blood pH values of rabbits experimented upon during the hot month of July are highly variable and inconsistent, when compared with those of March-May series. Both the alkali reserve and blood pH values are either decreased to a very minor extent or are even increased upon the glucose administration. In spite of this variability among the blood pH and alkali reserve values, the existence of a high level of hyperglycemia indicated that due to the probable lowered metabolic state of the animals during the hot season, the administered glucose is directly converted to glycogen for storage and not broken down to its intermediary acid metabolic products. Therefore no acidosis has been observed in the majority of animals of this series.

5) Injections of an equimolar sucrose solution (47.5 %) to two rabbits had no lowering effect on the alkali reserve values. This finding substantiates our conclusions in the succeeding article (TERZIOĞLU and ERÖZ : this journal) that the small amount of sucrose remaining in the organism following its subcutaneous delivery is not split into glucose and therefore does not provoke any acidosis.

BIBLIOGRAPHY

1. — BECKMANN, K. *Ztschr. f. exp. Med.*, 1922, 29, 579-595.
2. — BUEDING, J. F., J. F. FAZEKAS, H. HERRLICH and H. E. HIMWICH. *Science*, 1942, 95, 282.
3. — CAMPBELL and MALTBY. *J. Clin. Invest.*, 1928, 6, 303; cited by SCHMIEDT, E. *Ztschr. f. exp. Med.*, 1935, 95, 288-294.
4. — KLEIN, D. *J. biol. chem.*, 1942, 145, 41-43.
5. — KURIYAMA. *J. biol. chem.*, 1918, 33, 215; cited by BECKMANN, see above for reference.
6. — MARKEES, S. and A. MENCZER. *Schweiz. Med. Wochenschrift*, 1946, 76, 1, 337-343.
7. — PETERS, J. P. and D. D. VAN SLYKE. "Quantitative Clinical Chemistry" vol. II, (methods), Baillière, Tindall and Cox, London, 1932.
8. — POWER, M. H. and N. M. KEITH. *J. biol. chem. (Proceedings)*, 1936, 114, LXXX.

9. — TERZIOĞLU, M. *Revue de la Faculté des Sciences de l'Université d'Istanbul*, 1945, Série B, 10, 96-114.
- 9b. — TERZIOĞLU, M. and K. ERÖZ. This Journal.
10. — TERZIOĞLU, M. This Journal.
11. — WYMER, I. *Arch. Klin. Chir.*, 1926, 143, 200-233.
12. — ZUNZ, E. and E. CRASCINESCU. *Arch. intern. pharmacodyn.*, 1938, 58, 213-239.

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, UNIVERSITY OF ISTANBUL

THE FATE OF SUBCUTANEOUSLY INJECTED SUCROSE
IN THE RABBIT

BY

MELIHA TERZIOĞLU AND KÂMURAN ERÖZ

(Received for publication 5-3-1949).

The majority of workers in literature who have concerned themselves with the problem of the fate of sucrose in the organism, believe that this disaccharide when delivered intravenously or subcutaneously is either totally or largely excreted in urine. For this reason, a solution of sucrose equimolar to that of glucose, employed by us in our regeneration experiments, seemed to be a suitable control for our experimental animals (TERZIOĞLU : this journal). However, since some increase in blood volume as well as in the number of erythrocytes and hemoglobin concentration was also obtained subsequent to injections of sucrose solutions, it seemed necessary to investigate the fate of this carbohydrate in rabbit, in order to be able to account for the observed changes in blood. Before giving an account of our experiments along this line, the literature on this controversial problem will be reviewed.

Early in 1897, VOIT observed a quantitative excretion of sucrose and lactose upon the subcutaneous administration of these disaccharides into young rats. Later WEINLAND (1905) noted that following the injections of cane sugar to young rats, invertin developed in blood. This finding was confirmed by ABDERHALDEN and KAPFBERGER (1910) who found that serum or plasma of dogs, injected subcutaneously or intravenously with sucrose, splits not only cane sugar but milk sugar as well. According to their results, sucrose is excreted in urine 7-8 hours following its subcutaneous administration, but only 15 minutes after its intravenous delivery. Using improved polarimetric and reduction methods in 1932, ABDERHALDEN and BUADZE re-attacked the problem and noted that upon the parenteral administration of cane sugar, invertin

was found both in serum and urine. However, the effect of this ferment on milk sugar was not confirmed. Other workers (FINE, 1930; BERG, 1932), however, denied the formation of sucrose-splitting enzyme upon subcutaneous and intravenous injections of this sugar. The former author, who also investigated the excretion of sucrose, observed that not all of it was recovered in urine following its administration. In spite of this finding, he concluded that the body deals with injected sucrose by its quantitative excretion in urine, since subsequent to its injections no change in serum reducing power was observed, and traces of reducing sugars were rarely present in urine. In a series of papers concerning kidney function, KEITH, POWER, and co-workers (1932; 1935 *a*; 1935 *b*; 1936; 1937) investigated the fate of intravenously injected sucrose in dogs and in man. They found that following the intravenous injections of sucrose to normal men, the amount excreted in urine was more or less quantitative, varying in range from 89-98 % in the various subjects investigated. Twelve to twenty-four hours after the injections, urine as well as plasma was free of sucrose. They further noted (KEITH, POWER, and PETERSON, 1935 *a*) that the recovery in urine during a definite period after the injection was constant and paralleled the simultaneously determined value for the plasma sucrose clearance. In patients with renal insufficiency, both the excretion of sucrose in urine and its diminution in blood were delayed, sucrose being still detected in urine for as late as 72-96 hours following its injection, although the total amount recovered was in the same range, 88-99 %, as in normal men (KEITH, POWER, and PETERSON, 1935 *b*). Based on these results, the authors concluded that the human organism is unable to attack the intravenously delivered sucrose and deals with it by its excretion in urine. However, the case was found not to be the same for the dog (POWER and KEITH, 1936). Since only 70-80 % of the injected sucrose appeared in urine and since the reducing sugar, largely levulose, was found in considerable amounts in urine, the authors concluded that inversion really takes place in this animal. Moreover upon the injection into dogs of large amounts of more concentrated solutions of sucrose, it was found in considerable quantities in all tissues examined, being especially concentrated in the liver and kidney.

The quantitative recovery of the injected sucrose 24 hours after its administration to normal men has been noted by LAVIETES, BOURDILLON, and KLINGHOFFER (1936).

It is evident from this brief review of literature that most workers agree on the excretion of the large part of intravenously or subcutaneously injected sucrose, but no definite conclusion can be reached as to that

small quantity remaining in the organism. Since some stimulating effect of sucrose, similar to that of glucose, was observed in our regeneration experiments, we performed the following experiments in order to decide as to whether this remaining portion might be hydrolyzed into glucose.

MATERIAL AND METHODS

Altogether 11 rabbits were used, but nos. 30 and 31 were experimented upon twice in order to investigate as to whether any invertin would develop as a result of single injections of sucrose. Therefore 13 experiments are reported.

Rabbits which had been starved for 15 hours were injected with 4 ml per kilo of body weight of sucrose solutions, varying from 10 to 39 % in concentration. This fluid amount was chosen in order to correspond to that of the glucose solution administered. The quantity of sucrose in urine was determined polarimetrically, after deproteinization of urine with 30 % lead acetate. In order to avoid glycolysis of sucrose, determinations were made immediately after urination, when possible. A crystal of thymol was placed in the cup when urine had to be collected over-night. Determinations were made on the various samples obtained subsequent to injections until no trace of sucrose was detected in urine. At the same time, the presence of glucose in urine was sought by the Benedict qualitative test.

RESULTS

In 10 out of 13 experiments, 80-100 % of the injected sucrose was recovered in urine while in the remaining three (32, 30, 37) only 75, 67.8, and 70.5 % of sucrose was excreted, respectively (TABLE I). No difference was observed in the percentage quantities of sucrose excreted between animals injected with more (35-39 %) than with less concentrated (10-16 %) solutions of sucrose. The search for reducing sugar in urine yielded negative finding, while the blood glucose in the majority of animals revealed slight variations above or below the initial values. In two animals (nos. 36 and 38) practically no change in blood sugar level was observed as a result of sucrose injections. This is understandable in the case of no. 36 which excreted the total amount of the sucrose administered, but not in no. 38, that retained over 16 % of this disaccharide.

TABLE I

The blood sugar level and the amount of sucrose in urine of rabbits injected with 47.5 % sucrose solution (4 ml per kilo of body weight)

Animal no.	Time in hrs. after injection	Conc. of sucrose injected (%)	Amount of sucrose injected in ml. g.		Amount of sucrose excreted (g)	Amount of sucrose left in organism (g)	% amount of sucrose excreted	Blood sugar level (mg %)
30 a	Initial	10	17.5	1.75				115
	2							97
	4							121
	6							123
	24							112
	27				1.588	0.162	90.7	
31 a	Initial	10	17	1.7				94
	2							105
	4							113
	6							116
	30				1.463	0.237	86	
32	Initial	10	15	1.5				104
	2							117
	4							112
	6							100
	24							96
	39				1.124	0.376	75	
30 b	Initial	10	17	1.7				102
	2							92
	4							103
	6							103
	24							105
	39				1.153	0.467	67.8	
31 b	Initial	10	17	1.7				100
	2							105
	4							116
	6							123
	24				1.410	0.290	83	106
33	Initial	39	16	6.24				100
	2							114
	4							120
	6							117
	24				5.019	1.221	80.4	97

TABLE I (continued)

Ani- mal no.	Time in hrs. after injection	Conc. of sucrose injected (%)	Amount of sucrose injected in		Amount of sucrose excreted (g)	Amount of sucrose left in organism (g)	% amount of sucrose excreted	Blood sugar level (mg %)
			ml.	g.				
34	Initial 2 4 6 24	39	16	6.24				115 128 137 144 155
					5.533	0.707	88.7	
35	Initial 2 4 6 24	39	15	5.85				117 116 127 116 110
					5.331	0.519	91.1	
36	Initial 2 4 6 24	39	14	5.46				101 102 100 102
					5.48	0	100	
37	Initial 1 2 4 6 24 48	39	16	6.24				110 93 94 107 121 110
					4.399	1.841	70.5	
38	Initial 1 2 4 6 24	39	16	6.24				102 106 102 99 99
					5.2	1.04	83.3	
39	Initial 1 2 4 6 24	16	17	2.72				122 115 98 105 103
					2.596	0.130	95.4	
40	Initial 1 2 4 6 24	35	17	5.45				110 105 99 103 110
					5.049	0.401	92.6	

The deviations from the initial in blood sugar values of the other experimental animals was either in the nature of an increase, such as was observed in 6 (nos. 31*a*, 32, 31*b*, 33, 34, and 35) or a temporary decrease succeeded by an augmentation, as was evident in five of the rabbits (nos. 30*a*, 37, 30*b*, 39, and 40). The maximum extent of variations in blood sugar level of these animals lay within 20-30 mg% above or below the initial values. However, when these variations are compared with those of control animals in our other set of experiments (ERÖZ and TERZIOĞLU : this journal), they seem to be within the normal range of variability, though the frequency of variation is larger in the present than in the other series of experiments. No correlation is to be observed between these changes in blood sugar level and the amount of sucrose retained in the organism.

In two rabbits (30, 31) the same procedure was repeated ten to twelve days later in order to find out whether any invertin had developed during the interval. In one animal (31*b*), the amount of sucrose excreted and the alterations in blood sugar level were nearly the same as previously (31*a*) while in the second (30*b*) nearly 30 % more sucrose than formerly was retained in the organism.

DISCUSSION

The results of our experiments on the fate of subcutaneously injected sucrose into rabbits indicated that 80-100 % of it, irrespective of the concentration of solutions employed, may be recovered in urine 24-40 hours after its administration. Since the variations in blood sugar level are of too small a magnitude to suggest the hydrolysis of the remaining quantity into glucose, we are as yet undecided as to its fate in the rabbit. Even if the remaining sucrose were split into glucose, the latter is either rapidly oxidized into its final metabolic products or undergoes conversion into glycogen for storage. Of the two suppositions the former seems unlikely since the alkali reserve values of two rabbits injected with sucrose were not diminished (ERÖZ and TERZIOĞLU : this journal). A third possibility is that sucrose may be stored in tissues of the rabbit, such as had been postulated for the dog by POWER and KEITH (1936).

SUMMARY

1) Rabbits injected subcutaneously with solutions of sucrose varying from 10 to 39 % in strength excreted in urine 80-100 % of this disaccharide, bearing no relation to its quantity delivered.

2) The blood sugar values determined at various intervals within 24 hours, subsequent to injections, varied within a normal range. Therefore the amount of sucrose remaining in the organism following its subcutaneous delivery does not undergo hydrolysis.

3) No reducing sugar was found to be present in urine.

4) Two experiments conducted with the purpose of investigating as to whether any invertin would develop on subcutaneous injections of sucrose did not offer any positive evidence along this line.

BIBLIOGRAPHY

1. — ABDERHALDEN, E. and S. BUADZE. *Fermentforschung*, 1932, 13, 228-243.
2. — ABDERHALDEN, E. and G. KAPFBERGER. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1910, 69, 23-49. (Abstracted in *Chemisches Zentralblatt II*, 1, 1828.
3. — BERG, G. *Arch. f. exp. Pathol.*, 1932, 163, 713-725.
4. — ERÖZ, K. and M. TERZIOĞLU. This Journal.
5. — FINE, J. *Biochem. J.* 1930, 24, 1282-1293.
6. — KEITH, N. M. and M. H. POWER. *Am. J. Physiol.*, 1937, 120, 203-211.
7. — KEITH, N. M., M. H. POWER. and R. D. PETERSON. *Am. J. Physiol.*, 1934, 108, 221-228.
8. — KEITH, N. M., M. H. POWER. and R. D. PETERSON. *Am. J. Physiol. (Proceedings)*, 1935 a, 109, 62.
9. — KEITH, N. M., M. H. POWER and R. D. PETERSON. *Am. J. Physiol. (Proceedings)*, 1935 b, 105, 60-61.
10. — LAVIETES, P. H., J. H. BOURDILLON and K. H. KLINGHOFFER, *J. Clin. Invest.*, 1936, 15, 261. Cit. by KEITH, N. M. and M. H. POWER, *Am. J. Physiol.*, 1937, 120, 203-211.
11. — POWER, M. H. and N. M. KEITH. *J. biol. chem. (Proceedings)*, 1936, 114, LXXX.
12. — TERZIOĞLU, M. This Journal.
13. — VOIT, F. *Deutsches Arch. f. klin. Med.*, 1897, 58, 523-641. (Abstracted in *Chemisches Zentralblatt*, 1897, II, 867).
14. — WEINLAND, E. *Ztschr. f. Biol.*, 1905, 47, 279-298 (Abstracted in *Chemisches Zentralblatt*, 1905 (2), 76 Jhrg., 1274).

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, UNIVERSITY OF ISTANBUL

THE EFFECT OF GLUCOSE INJECTIONS ON THE REGENERATION OF BLOOD IN THE RABBIT

BY

MELIHA TERZIOĞLU

(Received for publication 5-3-1949).

Since the time of PAUL BERT (1878), the results of innumerable experiments at high altitudes or in the pneumatic chambers in the laboratory have indicated that erythropoiesis is mainly due to a decrease in the partial pressure of oxygen in atmospheric air. However, two lines of experimental evidence (DALWIG, KOLLS, and LOVENHART, 1915; MILLER, Jr., 1940) have diverged from this well-known theory and observed blood regeneration on exposure of animals to high concentrations of carbon dioxide. The latter author attributed this stimulation of bone marrow to a tissue anoxia resulting from a depression of tissue oxidations by carbon dioxide.

In the light of these earlier experiments, it seemed very unlikely that neither the decrease in the partial pressure of oxygen nor the increase in carbon dioxide content in the inspired air were specific factors which stimulated the bone-marrow to increased erythropoiesis. It was postulated that a possible alteration in the acid-base equilibrium of the organism may be the direct factor responsible for the increased blood regeneration under these two diverse conditions. In order to investigate this possible effect, a series of experiments (TERZIOĞLU, 1945) were carried out in rabbits, in which acidosis was induced by the feeding of oats, as had previously been shown by BECKMANN (1922). As was expected, accompanying the acidosis, there was an increase in erythrocyte count and hemoglobin concentration, though the two were not always of the same order of magnitude. This discrepancy was attributed to the insufficiency of iron in the diet of the animals. Thus in a second series of experiments, ferrous chloride, a compound easily absorbed into the blood stream from the subcutaneous site of injection,

was administered to rabbits on the acid diet. Under these conditions, the increase in hemoglobin concentration became of an equal or even greater magnitude than that of the erythrocyte count, and the color index which was low in the first series of rabbits on the acid diet rose above unity. That the increase in red blood cell count was not due to a hemoconcentration was proved by the accompanying augmentation in plasma volume, as well as the regular increase in reticulocyte count. Furthermore when the acid diet was replaced by that of vegetables, within two to four weeks there was a general reduction towards normality of all values investigated.

These results were interpreted by a theory that is analogous to WINTERSTEIN's well-known reaction theory of respiration; namely, that the stimulation of the respiratory center is brought about by the increase in H-ion concentration of blood or within the neurons of the center itself. It was postulated that the acid ions in blood of rabbits fed on oats may similarly stimulate the bone-marrow to erythropoietic activity.

Recently an article by MARKEES and MENCZER (1946) drew our attention to another type of acidosis induced by injections of hypertonic glucose solutions or of glucose solutions followed by those of organic acids. They injected rabbits with 2 grams of glucose per kilo of body weight, out of a 50 % glucose solution, and obtained blood at intervals of 60 to 345 minutes thereafter. The alkali reserve of blood as determined by the Van Slyke manometric method was decreased from 1.9 to 33 vols % CO_2 in the various animals investigated. Similar effect of glucose administration on alkali reserve was previously observed by WYMER (1926) in rabbits but not in man. He injected three rabbits with 10-50 ml of physiological glucose solution (equimolar glucose in physiological salt solution) and observed a drop in alkali reserve and acidity of urine, one and a half hours after the injection. In one rabbit, urine was still acid twenty-four hours following the glucose administration. A repetition of the same experiments in man, however, did not yield similar results, since the alkali reserve did not change, and the urine pH was found to be alkaline. According to CAMPBELL and MALTBY (1928), levulose feeding in man caused a lowering of alkali reserve.

MARKEES and MENCZER (1946) attributed this reduction of alkali reserve following injections of glucose, to the breakdown of the latter to its intermediary metabolic products; such as, pyruvic and acetic acids. Thus the oral administration of these acids to animals which previously had been "loaded" with glucose brought about the largest

drop in alkali reserve, accompanied by a pronounced hyperglycemia.

The following experiments were conducted with the purpose of investigating the effect of glucose acidosis, as induced by MARKEES and MENCZER, on the regeneration of blood in the rabbit. The preliminary experiments dealing with the influence of the dosage of glucose employed on blood sugar level, alkali reserve, blood and urine pH 's are separately reported (ERÖZ and TERZIOĞLU: this journal). It suffices to mention that with the dosage employed in the following experiments, we also noted a drop in alkali reserve and urine- and blood pH 's lasting for 6-8 hours in the majority of animals, and in some for 24 hours, following the glucose administration.

MATERIAL AND METHODS

Of the twenty-seven rabbits used in the three experimental series all were males, with the exception of nos. 5 and 12. The reason for the preference of male animals was that during the course of experimentation a few of the female rabbits gave birth to litters, conception having occurred prior to the commencement of the experimental period, and had to be discarded. The majority of the animals weighed 2000-2500 grams, the only three exceptions being nos. 15 and 21 which were below this weight-range, and no. 10 which was 3300 grams in body weight at the start of experimentation.

The experiments are reported in three series arranged according to the period during which they were conducted. Of the *first series*, rabbits 1-6 were experimented upon from October of 1946 until February of 1947 and rabbits 7-13 from February until the end of May of 1947. The experimental period of the *second series* lay within the very hot months of June and July of 1947, while for the third series the time of experimentation extended from January until May of 1948. All animals were fed on the laboratory diet of vegetables which consisted of carrots, cabbage, and lettuce.

In the first and second series of experiments, urine pH was determined on over-night samples for three to four consecutive days in the pre-experimental period, and subsequently hematological studies were made for obtaining the pre-experimental values. Rabbits were injected daily for four weeks with 2 grams of glucose per kilo of body weight out of a 25 % glucose solution. The isotonic-salt solution controls were administered with the same amount of fluid as they would have received had they been injected with glucose solution. On the idea

that an equivalent quantity of fluid may not be sufficient for a control solution led us to use an equimolar solution of sucrose (47.5 %). Experiments dealing with the fate of this injected sucrose in the organism are separately reported (TERZIOĞLU and ERÖZ : this journal).

Hematological determinations were made at the end of the second and fourth week of injections as well as two to four weeks following the termination of the injection period. *Urine pH* was determined electrometrically, by the use of the hydrogen electrode, on over-night samples twice a week during the experimental period. *Blood volume* was estimated by a modification of a method described by SOMOGYI, WIRZ, and VERZAR (1945), using the colloidal Geigy-blue dye 536. On account of the difficulty encountered in the administration of the dye solution into the ear vessels, without losing some of it into the extravascular area, we obtained blood directly from the heart and injected the dye into it. The manner of injection of the dye as well as withdrawal of blood samples is described as follows :

Rabbits are very easily hypnotized when held by the fore- and hind-legs and turned suddenly to be laid in a supine position on the fixing board. The fore- and hindlegs as well as the head are then firmly fixed on the board, with often none or very little disturbance on the part of the animal. The hair overlying the chest is then shaved off, the skin is cleaned with a tincture of iodine solution, and subsequently alcohol, and left off to dry for a few minutes. Then a syringe needle attached to a 5 ml syringe is plunged vertically over the spot where the heart beat is felt most distinctly. The site where the heart beats most forcefully often varies in various animals, in the majority lying at the junction of the 3rd or the 4th intercostal space with the sternum. The needle glides in very easily as soon as it is in the ventricle, and blood fills the syringe readily. If the needle is not in the ventricle, that is if the syringe fill very slowly with foaming blood and much force is required to move the piston, it is wise to withdraw the needle and start all over again. As soon as 1-1.5 ml of blood is withdrawn, the needle that is left in the ventricle is detached from the syringe, and the blood is emptied into a centrifuge tube. Immediately the 1 ml syringe, divided into 100 divisions, and containing the required amount of dye solution to be injected (0.15 ml/kg of a 1 % Geigy-blue in saline) is attached to the syringe needle in the ventricle, and the dye is quickly delivered. Following the delivery of the dye, the syringe is washed several times by repeated withdrawal of blood into the syringe and re-injection into the ventricle, until no trace is left neither in the syringe nor in the needle. Finally, the needle is withdrawn out of the heart

and the animal is left in the same supine position for five minutes to insure a complete mixing of the dye solution within the circulatory system. During this interval of time, care should be taken for the maintenance of absolute quiet in the vicinity of the animal, since rabbits are very easily excitable, and the slightest noise is enough to upset the animal and thus alter the blood volume. At the end of five minutes, blood is again withdrawn out of the heart by the same procedure.

Both samples are left off to coagulate for 20-25 minutes, and the coagulum is then separated from the walls of the tube with a fine glass rod. Coagulated blood samples are then centrifuged for 20 minutes at a speed of 2000 revolutions per minute.

The amount of dye in the second sample of serum is calculated from its extinction coefficient, as determined by the Pulfrich-Stufen photometer, using red filter S 61 and cuvettes of 1 mm in width. The non-dyed first sample of serum serves as a control. Prior to commencement of experimentation, a dilution series of Geigy-blue in rabbit serum, in a concentration range of 0.001-0.01 gm %, was prepared, and extinction coefficient of each dilution was determined. From the straight standard curve so obtained, the amount of dye in the unknown serum can be easily read from its extinction coefficient.

Plasma volume is calculated from the percentage dye concentration by the following equation :

$$\text{Plasma volume} = 100 \times \frac{\text{amt. of dye injected (mg)}}{\text{dye (mg) in 100 ml}}$$

As for the other dye methods, determination of hematocrit value is needed for the estimation of the blood volume. A 1 % liquid solution is sucked into standard hematocrit capillary tubes, which are left off to dry in a thermostat. As soon as the first sample of blood is withdrawn from the heart, blood is sucked into these hematocrit tubes and centrifuged at a speed of 3000-3500 revolutions per min. for a half hour. The percentage erythrocyte value is read from the hematocrit, and from the percentage plasma volume that of whole blood is calculated.

The *percentage of hemoglobin* in blood was determined by the Sahli method, using Sahli tubes standardized to 16 grams of hemoglobin in 100 ml of blood as normal. The *erythrocyte count* was made with a modified Neubauer's hemocytometer, using Toisson's in earlier and Hayem's solution in the latter series of experiments. Both hemoglobin and erythrocyte determinations were made in duplicate, or until the difference between the two determinations did not exceed 3 % for hemoglobin and 200,000 for the erythrocytes.

The *reticulocyte count* was performed as previously described (TERZIOĞLU, 1945).

For the determination of *color index*, a new calculation method was employed where the initial hemoglobin and erythrocyte values were accepted as 100 %, thus yielding a normal index of unity as 1. For all other experimental periods, the color index was calculated by dividing the percentage deviation of hemoglobin concentration, as calculated relative to alterations in blood volume, by the percentage deviation of erythrocyte count, similarly related to changes in blood volume. Thus for rabbit 8, at the end of two weeks of glucose injections, the percentage deviation of hemoglobin amount from the initial period, 160.1, divided by the percentage deviation of erythrocyte count, 157.9, yielded a color index of 1.01.

In order to establish the extent of alterations in blood volume, the value for each period was expressed as percentage of the initial value, which was taken as 100, and the real changes in the amount of erythrocytes and hemoglobin were therefore determined according to the formulae: $\frac{VE_2}{E_1}$, $\frac{VHb_2}{Hb_1}$, respectively. V represents the blood volume in% (the initial value taken as 100), E_1 , Hb_1 are the number of erythrocytes and hemoglobin concentration at the beginning, and E_2 and Hb_2 at the end of the period, respectively.

Thus in rabbit 8, two weeks after the glucose injections, the blood volume had increased to 171 % of the initial value as 100. The determined erythrocyte value for the same period was 6.012×10^6 ; while it was 6.508×10^6 initially. Therefore the percentage increase was $\frac{6.012 \times 171}{6.508} = 157.9$. A similar calculation yielded the percentage change for the hemoglobin amount.

RESULTS

Urine pH was determined only for rabbits of the *first* and *second* series, and no difference between the pre-experimental and experimental values was noted. For both series the urine pH values lay within a wide range of 7-9, the majority being around pH of 8.5.

The total blood volume increased in seven out of 10 rabbits of the *first* series, as a result of glucose injections for a period of four weeks. The range of this percentage increase over normal was variable, extending from 110.8 to 171 %, as is revealed in table I. Moreover, although

TABLE I
The results of experiments on rabbits of first series,
injected with 25 % glucose solution in doses containing 2 grams of glucose per kilo of body weight

Animal no.	Experimental conditions	Hema- to- crit value	Blood volume (ml)	Blood volume as % of initial (V)	Det. erythro. value (1×10^6)	$V E_2$ — E_1	Det. % Hb	$V Hb_2$ — Hb_1	Color index	Reticulo. per 1000 erythro.
1	Initial	37	158.7	100	5.816	100	71.5	100	1	14
	Glucose for 2 wks.	37	206.3	130	7.380	165	63	114.5	0.9	29
	Glucose for 4 wks.	39	226.3	142.6	7.370	180.7	67	136.6	0.9	24
	2 wks. after glucose	35	192.3	121.2	6.104	127.2	71	120.4	1	18
	4 wks. after glucose	35	153.8	96.9	5.996	99.9	68	92.2	0.9	12
2	Initial	36	127	100	6.176	100	64	100	1	30
	Glucose for 2 wks.	41	198.6	156.4	8.120	205.6	75	183.9	0.89	36
	Glucose for 4 wks.	36	183.1	144.2	7.730	180.4	73	164.4	0.91	33
	2 wks. after glucose	37	186	146.4	7.064	167.5	61	139.6	0.83	35
	4 wks. after glucose	37	192.4	151.5	6.916	165.7	66	156.2	0.92	20
3	Initial	36	165	100	5.801	100	64	100	1	20
	Glucose for 2 wks.	42	165.6	100	6.115	105.4	61	95.3	0.9	25
	Glucose for 4 wks.	40	166.7	101	6.980	120.3	81	126.6	1.05	32
	2 wks. after glucose	38	177.4	107.5	6.448	119.5	69	115.9	0.97	21
	4 wks. after glucose	36	177.6	107.6	6.004	111.3	70	117.7	1.06	11
4	Initial	38	161.3	100	6.580	100	72	100	1	13
	Glucose for 2 wks.	38.5	153.8	95.4	6.988	101.3	68	90.1	0.89	38
	Glucose for 4 wks.	39	191.2	118.6	7.068	127.4	69	113.7	0.89	24
	2 wks. after glucose	32	160.9	100	6.312	95.9	64	88.9	0.93	14
	4 wks. after glucose	32	160.9	100	6.312	95.9	64	88.9	0.93	14
5	Initial	34.5	198.5	100	5.384	100	59	100	1	24
	Glucose for 2 wks.	35.5	201.6	101.6	6.660	125.6	60	100	0.82	25
	Glucose for 4 wks.	36	191.8	96.6	6.900	128.2	62	105	0.82	25
	2 wks. after glucose	38.5	191.8	96.6	6.600	118.4	63	103.3	0.87	25
	4 wks. after glucose	38.5	191.8	96.6	6.608	118.6	73	119.5	1.007	17

TABLE I (continued)

Animal no.	Experimental conditions	Hema-tocrit value	Blood volume (ml)	Blood volume as % of initial (V)	Det. erythro. value (1×10^6)	$\frac{V E_2}{E_1}$	Det. % Hb	$\frac{V Hb_2}{Hb_1}$	Color index	Reticulo. per 1000 erythro.
6	Initial	42	208.6	100	7.132	100	74	100	1	11
	Glucose for 2 wks.	43	243.8	114.2	7.828	128.3	70	110.6	0.86	24
	Glucose for 4 wks.	35.5	217	104	6.376	93	66	92.8	0.99	18
	2 wks. after glucose	39	175.5	84.1	7.236	85.4	71.5	81.3	0.95	21
7	Initial	36	161.5	100	6.716	100	62	100	1	18
	Glucose for 2 wks.	36	275.7	170.7	6.364	161.8	64	176.2	1.09	56
	Glucose for 4 wks.	38	193.5	119.8	7.720	137.6	69	133.3	0.97	44
	2 wks. after glucose	44.5	227	140.6	7.572	158.5	80	181.4	1.13	27
	4 wks. after glucose	41	184.8	114.4	8.172	139.2	72	167.3	1.2	10
8	Initial	35	142	100	6.508	100	62.5	100	1	15
	Glucose for 2 wks.	35	242.8	171	6.012	157.9	58.5	160.1	1.01	32
	Glucose for 4 wks.	36.5	157.4	110.8	6.890	117.3	65	115.3	0.98	24
	2 wks. after glucose	37	235	165.5	7.660	194.8	70.5	186.7	0.96	14
	4 wks. after glucose	37	147.6	103.9	6.696	107	67.5	112.3	1.05	13
9	Initial	39	135.4	100	6.344	100	89	100	1	31
	Glucose for 2 wks.	36.5	190.8	140.9	6.472	143.8	62	98.2	0.68	40
	Glucose for 4 wks.	36	189.2	139.7	6.300	138.8	61	95.8	0.69	56
	2 wks. after glucose	40	200.2	147.9	7.120	165.9	72	119.6	0.72	23
	4 wks. after glucose	38.5	216.7	167.6	7.395	186.6	72	129.5	0.69	25
10	Initial	37.5	228.5	100	6.200	100	84.5	100	1	9
	Glucose for 2 wks.	34.5	231.3	101.3	6.308	103.1	65	77.9	0.76	25
	Glucose for 4 wks.	41	217.3	95.1	8.008	122.8	73	82.2	0.67	35
	2 wks. after glucose	37.5	188.2	82.4	7.152	95	77	75.0	0.79	6

The key to the abbreviations in this and the succeeding tables is as follows:

Det.: Determined; Erythro.: Erythrocytes; Reticulo.: Reticulocytes; E_1 and Hb_1 : initial erythrocyte and hemoglobin values, respectively; E_2 and Hb_2 : Erythrocyte and hemoglobin values determined at the indicated intervals.

the blood volume was increased to very high values at the end of the first two weeks of injections, this increase was not sustained in all of the animals during the second half of the experimental period. Generally, the values for blood volume in this latter period are lower than those of the first two weeks, though still above the initial percentage (TABLE I).

After stopping the glucose injections, the total blood volume was reduced to normal in rabbits 1, 7, and 8, at the end of four weeks; in rabbits 4 and 6 to normal and below normal, at the end of two weeks; while it remained at an augmented level in rabbits 2 and 9. Of the remaining three which had not shown any increase during the injection period, the blood volume of rabbit 10 was reduced to a very low value of 82.4 % (TABLE I).

There was no significant change in blood volumes of rabbits 11 and 12 injected with isotonic-salt solution, while that of rabbit 13 was reduced to below normal during the experimental period as well as in the two succeeding weeks (TABLE II).

The results obtained on the three rabbits in the *second* series, injected with glucose solution during the very warm months of June and July, were not in accord with those of the first, although all experimental conditions were identical. In only one rabbit (no. 14) did the blood volume increase over that of normal after four weeks of glucose administration while in the other two it was reduced to below normal during the same period (TABLE III).

However, two weeks following the injection period, there was an increase of 121.5 % over the initial as 100 in rabbit 15. Also there was no appreciable change in the three rabbits injected with equimolar sucrose solution (TABLE III).

In the *third series* injected with glucose an increase in blood volume was observed in four out of five rabbits, after four weeks of injections (TABLE IV). In the only rabbit (no. 21) which did not show any increase during the experimental period, as well as in rabbits 23 and 24, there was what might be referred to as an "after effect" of injections; namely, a large augmentation in blood volume two weeks following the injection period. However, this increase was succeeded by a depression to below normal in rabbits 21 and 23 at the end of four weeks following the glucose administration (TABLE IV).

The three rabbits injected with sucrose solution also responded with an augmentation of blood volume at the end of the two-week injection period, though this increase was not of the same order of magnitude in rabbits 25 and 27 by the end of the fourth week (TABLE IV). In the

*The results of experiments on rabbits of the first series,
injected with isotonic-salt solution (4 ml per kilo of body weight)*

Animal no.	Experimental conditions	Hema- tocrit value	Blood volume (ml)	Blood volume as % of initial (V)	Det. erythro. value (1×10^6)	$\frac{V E_2}{E_1}$	Det. % Hb	$\frac{V \% Hb_2}{Hb_1}$	Color index	Reticulo. per 1000 erythro.
11	Initial	38	177.9	100	7.012	100	71.5	100	1	17
	Salt for 2 wks.	36	183.1	102.9	6.842	100.4	63	90.7	0.9	14
12	Initial	38	144.2	100	6.608	100	76	100	1	23
	Salt for 2 wks.	36.5	140.1	97.2	6.260	92	71.5	91.4	0.99	22
	Salt for 4 wks.	38	151.9	105.3	6.640	105.8	80.5	111.6	1.05	29
13	Initial	37	185.2	100	6.424	100	72.5	100	1	30
	Salt for 2 wks.	38.5	155.3	83.9	6.826	89.2	76.5	88.5	0.99	26
	Salt for 4 wks.	39	156.7	84.6	6.560	86.4	69.5	81.1	0.94	24
	2 wks. after salt	39	163.8	88.4	6.980	96.1	76	92.7	0.96	26

third animal (no. 26), the initial increase was followed by a depression to below normal at the termination of the fourth week of injections. After stopping the sucrose administration, blood volume was reduced to practically normal after four weeks in rabbit 25, remained below normal in rabbit 26, and was reduced to below normal in no. 27 (TABLE IV).

Erythrocyte count. — In the *first series* of rabbits, the erythrocyte count was highly increased in 7 out of 10 animals at the end of two weeks of glucose administration, the range being 125.6 to 205.6 % of the initial as 100. The remaining three (nos. 3, 4, and 10) which did not respond during the first two weeks, similarly revealed an augmentation in erythrocyte number at the end of the fourth week of glucose injections (TABLE I). Thus it can be concluded that injections of glucose for four weeks increased the erythrocyte count in all of the animals investigated. As for the blood volume, the animals which responded with a large increase in erythrocyte count during the first two weeks did not retain the high values by the end of the fourth week, the erythrocyte count being somewhat lowered in three (nos. 2, 7, and 8) and dropping to below normal in one (no. 6, TABLE I).

After stopping the injections, there was a reduction of erythrocyte count towards normal in all animals but one (no. 9), by the end of the fourth week. During this period the erythrocyte count of rabbit no. 9 was still further increased, being 186.6 % of the initial value as 100.

The erythrocyte count in two (nos. 11 and 12) of the three controls injected with isotonic-salt solution did not alter appreciably during the experimental period while that of the third (no. 13) was depressed to below the initial value (TABLE II).

In all three rabbits of the *second series* injected with glucose solution, the erythrocyte count was depressed to below normal at the end of the second experimental week and was still further lowered in animals 15 and 16 by the end of the fourth week of injections. Two weeks following the injection period, an "after-effect" was observed in rabbit 15, whose erythrocytes had increased 121 % over normal as 100 (TABLE III).

The three sucrose-injected controls of this series yielded similar results, in that there was a reduction in erythrocyte count in two (nos. 17 and 18) and no change in one (no. 19) during the experimental period (TABLE III).

In the *third series*, out of five rabbits injected with glucose, the erythrocyte count increased in two (nos. 20 and 22) at the end of the second week and in all by the end of the fourth week of injections (TABLE IV).

TABLE III

The results of experiments on rabbits of second series, injected with 25 % glucose solution in doses containing 2 grams of glucose per kilo of body weight and with sucrose solution (4 ml per kilo of body weight)

Animal no.	Experimental conditions	Hema-tocrit value	Blood volume (ml)	Blood volume as % of initial (V)	Det. erythro. value (1×10^6)	$\frac{V E_2}{E_1}$	Det. % Hb.	$\frac{V Hb_2}{Hb_1}$	Color index	Reticulo. per 1000 erythro.
14	Initial	43	171.2	100	8.540	100	81.5	100	1	27
	Glucose for 2 wks.	34	162.2	94.7	6.572	72.9	67	77.9	1.07	27
	Glucose for 4 wks.	34	212.6	124.2	7.000	101.8	67	102.1	1	26
	2 wks. after glucose	42.5	200.2	116.9	7.812	107	72.5	104	0.97	24
15	Initial	36.5	143.1	100	7.416	100	73	100	1	16
	Glucose for 2 wks.	33	130.6	91.3	7.068	87	60	75	0.86	11
	Glucose for 4 wks.	35	113.2	79.1	7.304	77.9	63	68.3	0.88	17
	2 wks. after glucose	39.5	173.8	121.5	7.428	121.7	66.5	110.8	0.91	11
16	Initial	42	164.8	100	8.48	100	74	100	1	24
	Glucose for 2 wks.	38	166.4	101	7.551	89.9	66.5	90.7	1.01	26
	Glucose for 4 wks.	37	111.6	67.7	8.116	64.8	67	61.3	0.95	28
	2 wks. after glucose	31	140	84.9	7.372	73.8	63	72.3	0.98	13
17	Initial	35.5	187.9	100	5.880	100	62.5	100	1	8
	Sucrose for 2 wks.	30	190.4	101.3	5.596	96.4	52	84.3	0.87	9
	Sucrose for 4 wks.	33.5	150.4	80	6.248	85.1	60	76.8	0.9	12
18	Initial	38	182.1	100	7.244	100	75	100	1	27
	Sucrose for 2 wks.	36	177	97.2	6.256	83.9	62	80.4	0.96	20
	Sucrose for 4 wks.	40	171.7	94.3	6.928	90.2	68	85.5	0.95	20
19	Initial	35	146	100	6.372	100	64	100	1	11
	Sucrose for 2 wks.	33	153.7	105.3	6.216	102.7	63	103.6	1.01	19
	Sucrose for 4 wks.	34.5	157.2	107.7	6.272	106	62.5	105.2	0.99	16

TABLE IV

The results of experiments on rabbits of third series, injected with 25 % glucose solution in doses containing 2 grams of glucose per kilo of body weight and with 47.5 % sucrose solution (4 ml per kilo of body weight)

Animal no.	Experimental conditions	Hema-tocrit value	Blood volume (ml)	Blood volume as % of initial (V)	Det. erythro. value (1×10^6)	$\frac{V E_2}{E_1}$	Det. % Hb.	$\frac{V Hb_2}{Hb_1}$	Color index	Reticulo. per 1000 erythro.
20	Initial	37	149.2	100	7.260	100	68	100	1	20
	Glucose for 2 wks.	35	170.8	114.5	7.424	117.1	66.5	112	0.96	33
	Glucose for 4 wks.	36	203.8	136.6	7.296	137.3	65	130.6	0.95	30
	2 wks. after glucose	40	177.3	118.8	7.524	123.2	73	127.6	1.04	28
21	Initial	32	180.4	100	6.128	100	61	100	1	12
	Glucose for 2 wks.	36	136	75.4	7.196	88.5	66	81.6	0.92	28
	Glucose for 4 wks.	36	183.4	101.7	7.158	118.8	65	108.3	0.91	24
	2 wks. after glucose	38	206.4	114.4	7.216	134.7	69	129.4	0.96	16
	4 wks. after glucose	41.5	155.3	86.1	7.232	101.6	75	105.8	1.04	11
22	Initial	19.5	161.5	100	6.450	100	59.5	100	1	28
	Glucose for 2 wks.	33	203.5	126	7.096	138.6	69.5	147.2	1.06	49
23	Initial	41	144.1	100	8.144	100	75.5	100	1	13
	Glucose for 2 wks.	35	153.9	106.8	7.096	93.1	70.5	99.7	1.07	45
	Glucose for 4 wks.	37	160	111	8.164	111.3	69.5	102.2	0.92	32
	2 wks. after glucose	44	173.2	120.2	8.996	132.8	83.5	132.9	1	19
	4 wks. after glucose	38	108.5	75.3	9.108	84.2	68.5	68.3	0.81	13

TABLE IV (continued)

[illegible]

The three rabbits (nos. 21, 23, and 24) in which the increase was not very striking during the injection period revealed the "after effect" of increase two weeks following its termination. However, lower values for erythrocyte count was obtained when hematological studies were performed again two weeks later (TABLE IV).

Contrary to our expectations, the three sucrose-injected rabbits of this series all responded with an increase in erythrocytes at the end of the second injection week, though this response was not as marked (rabbit 25) or sustained (rabbits 26 and 27) by the end of the fourth week (TABLE IV). Again in rabbit 25, there was a large "after-effect" two weeks following the termination of the injection period.

In spite of the changes in erythrocyte number, it looks very paradoxical at first sight that little or no variation is to be observed in the hematocrit values of the three series (TABLES I-IV). This discrepancy can be explained by the accompanying total increase in blood volume as well as by the well-known fact that the newly formed cells are of a smaller volume than the older degenerating ones.

Hemoglobin concentration. — In the *first series*, although 8 out of 10 rabbits injected with glucose revealed an increase in erythrocyte count at the end of the second week of injections, only five of these showed an increase in hemoglobin concentration during the same period (TABLE I). Furthermore, in three (nos. 4, 5, and 10) out of the remaining five, hemoglobin concentration was depressed to values even lower than normal. However, the initial depression on two of these (nos. 3 and 4) was succeeded by an augmentation at the end of the fourth week of injections (TABLE I). The hemoglobin concentration which was markedly increased (160-184 %) in rabbits 2, 7, and 8 at the end of the second injection-week was of a smaller magnitude at the end of the fourth week, though still higher than normal. The "after-effect" of injections was apparent in these three, as well as in no. 2, in which hemoglobin was further increased after stopping the glucose administration (TABLE I).

As for the total blood volume and the erythrocyte counts, the hemoglobin concentration of rabbits in *series 2* was also decreased in some or was unaltered in others as a result of glucose as well as sucrose injections (TABLE III).

Out of five rabbits in the *third series*, all but one (no. 23) revealed an augmentation in hemoglobin concentration at the end of the fourth week of glucose injections, though unlike the changes in erythrocyte count only two responded by the end of the second week (TABLE IV).

Two weeks following the injection period, the hemoglobin concentration of three rabbits (nos. 21, 23, and 24) was increased to a much greater extent than that observed during the period of injections (TABLE IV). In the case of rabbit 24, which had shown only a very small increase during the entire injection period, the hemoglobin amount rose to 182.4 % above the normal percentage as 100, two weeks after the termination of glucose administration. However, hemoglobin concentration returned to normal in rabbits 21 and 24 and below normal in rabbit 23 after a further two-week period (TABLE IV).

The sucrose-injected rabbits similarly showed irregular variations in hemoglobin concentration during the injection period (TABLE IV). In rabbits 25 and 27, hemoglobin amount increased at the end of the second week of injections, that of no. 25 being sustained throughout the fourth while that of no. 27 being reduced to normality at the termination of the injection period (TABLE IV). On the other hand, hemoglobin concentration of rabbit no. 26, unaltered at first, was later reduced to below normal at the end of the second half of the experimental period. After stopping the injections, the "after-effect" of augmentation was observed in rabbit no. 25 in which hemoglobin concentration rose to 156.1 % above the initial percentage as 100.

It is thus apparent that in rabbits of *series 1 and 3* injected with glucose, there was a distinct tendency of the hemoglobin amount to augment, which in some cases was revealed or was further stimulated after stoppage of the injections. However, this increase was not as regular and in most cases not as marked as that of the erythrocyte count.

Color index. — In rabbits of the *first series* the ratio of $\frac{\text{Hb}}{\text{erythrocytes}}$ in % of the initial values, which we have utilized in the calculation of the color index, was generally lowered below the normal as unity, during the period of injections. In most of the animals, the color index was in the vicinity of 0.9 during the injection period; the exceptions being nos. 9 and 10 in which it was even lower, being 0.7; and nos. 7 and 8 in which it was unaltered (TABLE I). Two weeks after the end of the injection period, there was a tendency of the color index to return towards unity, though it was of an irregular nature in the individual animals investigated.

In the control rabbits of this series injected with isotonic-salt solution, color index was somewhat lowered in two (nos. 11 and 13) and remained the same in one (no. 12) during the period of injections (TABLE II).

In two out of three glucose-injected rabbits of the *second series*, the

color index was reduced to 0.86-0.95 at the end of the injection period, while it was practically unaltered in one (no. 14). Similarly, injections of sucrose to three rabbits lowered the color index in two (17, 18) and was without any effect in the third (no. 19, TABLE III).

The results on the color index of the *third series* corresponded well to the other two in that generally during the period of injections there was a tendency towards a lowering of the index (TABLE IV). This reduction was revealed in four out of five rabbits at the end of the second week of injections, though the index rose above unity at the end of the fourth week in rabbit no. 24. After stopping the injections, the color index rose above unity in all rabbits which had revealed the increase (TABLE IV).

The three rabbits injected with sucrose revealed somewhat a characteristic change in color index, in that after the initial lowering at the end of the second-injection week, the index rose above unity with the continuation of injections for a further two week period, but stopping the injections again reduced the color index to around 0.9 (TABLE IV).

Reticulocyte count. — With the exception of nos. 2 and 5, there was an increase in reticulocyte count in all rabbits of the *first series* injected with glucose solution (TABLE I). The failure to augment on the part of the reticulocytes of the above-mentioned animals is not understandable since the erythrocyte count was increased in both (being 205.6 % above the normal percentage as 100 % for no. 2). The only possible explanation may be that in these animals there already existed a condition of bone-marrow stimulation prior to the injection of glucose solution, as is revealed by the already high initial reticulocyte count. After stopping the injections, the reticulocyte count went down to below the initial values in all the animals investigated. The latter fact was even observed in the two rabbits (nos. 2 and 5, TABLE I) which had failed to reveal any increase in the reticulocyte count during the injection period. The possible significance of this may be that the over-stimulated bone-marrow during the period of injections may have been exhausted and may have entered a period of underactivity at the termination of glucose administration. As to the controls injected with isotonic-salt solution, no significant difference from the initial values in reticulocyte count was noted during the period of saline administration (TABLE II).

The three rabbits in the *second series*, whose erythrocyte numbers were reduced to below normal as a result of glucose injections, failed to show any appreciable changes in the reticulocyte count (TABLE III).

Furthermore, the reticulocyte number of rabbit 16 was reduced to nearly half the initial value following the termination of the injection period. Similarly the rabbits injected with sucrose failed to show any alteration in reticulocyte number during the same experimental period (TABLE III).

The five rabbits of the *third series* injected with glucose, all revealed an increase in reticulocyte count, this increase in some cases (nos. 21 and 23) being two or threefold the normal value. In spite of this large augmentation in reticulocyte count, the increase in erythrocyte values was not as marked as in rabbits of the first series. Furthermore in these two rabbits as well as in rabbit 24, the initial depression in erythrocyte number at the end of two weeks of injections was accompanied by the large increase in reticulocyte number (TABLE IV). Moreover, the "after-effect" of injections as revealed for blood volume, hemoglobin concentration, and erythrocyte count was not observed for reticulocytes. With the stoppage of injections, reticulocyte count in all rabbits returned to the initial values.

With the exception of rabbit no. 25 in which the largest change in blood volume, erythrocyte number, and hemoglobin concentration were observed, the reticulocyte count increased in the remaining two rabbits of the *third series* injected with sucrose solution (TABLE IV).

DISCUSSION

The regeneration of blood under the conditions of acidosis as induced by the injections of a 25 % glucose solution, in daily doses containing 2 grams of glucose per kilo of body weight, has been investigated. That glucose injections bring about a reduction in alkali reserve as well as a lowering of urine pH had been previously noted in the literature (WYMER, 1926; MARKEES and MENCZER, 1946) and has been further confirmed by us recently (ERÖZ and TERZIOĞLU, 1949). Although our experiments were carried along the same line as those of MARKEES and MENCZER, there were some modifications in the experimental procedure; such as, the strength of glucose solutions employed, the dosage of glucose administered, as well as the interval for blood withdrawal subsequent to the injections. Since a 50 % glucose solution when delivered daily to animals in our regeneration series was found to be irritating to the subcutaneous tissues, the strength of the solution employed was reduced to its half (25 %), though the amount of glucose delivered in a single injection corresponded to the dosage employed by the above

authors. For the same possible irritating effect of too many injections and the avoidance of the introduction of too large quantities of fluid into the organism, we gave only one injection of the glucose solution instead of the two subsequent deliveries as administered by MARKEES and MENCZER. Thus the total amount of glucose given in our experiments was only half of that injected by these authors, and consequently the variations in our alkali reserve values (ERÖZ and TERZIOĞLU, 1949) were not as great. Thus the extent of diminution of alkali reserve values in our experiments was between 3.5 to 12 vols % CO_2 , in contrast to 1.9 to 33 vols % CO_2 of those of MARKEES and MENCZER. However, it is evident from these figures that the range of variation in their experiments is greater than in ours.

The urine pH of rabbits in starvation that were injected with glucose solution was also diminished (ERÖZ and TERZIOĞLU, 1949), but in the present series of experiments, no such diminution was observed in animals of the *first* and *second* series whose urine pH was investigated two to three times weekly during the experimental period. This discrepancy can be well explained by the influence of food on urine pH, which would tend to be increased by the presence in the organism of alkaline-rich substances introduced in the vegetable food.

In the following pages, the general discussion of results will be limited only to those of the *first* and *third* series among which there is a well-founded consistency, while the results of the *second* series are not at all in agreement. As has been mentioned previously, the rabbits in the *second* series were experimented upon during the very hot months of June and July, when the unfit temperature conditions may have so lowered the metabolic state of the animal that the usual stimulating effect of glucose, or rather its intermediary-acid products, on blood regeneration was not observed. The same inconsistency and variation in results was evident in the alkali reserve and blood- and urine pH values of rabbits injected with glucose during the same period (ERÖZ and TERZIOĞLU, 1949). It is therefore postulated that due to lowered metabolic rate of the animal in hot weather, the injected glucose is not broken down to its intermediary acid-metabolic products, but is directly converted to glycogen for storage.

Total blood volume. — As a result of injections of hypertonic glucose solution, there was an increase in the total blood volume in 11 out of a total of 15 rabbits in the *first* and *third* series, at the end of the four-week injection period. Generally, the blood volume during the second half of the injection period was lower than that during the first. Two

weeks after the glucose administration was terminated, there was an "after-effect" of injections in that there was a further augmentation in blood volume in some of the animals investigated. In others, the blood volume was reduced to normal or below normal at the termination of this period, while in the majority the reduction to the pre-experimental level occurred at the end of four weeks. The blood volume of controls injected with isotonic-salt solution did not alter appreciably during the experimental period. Contrary to our expectations, an equimolar solution of sucrose used as a control in the *second* and *third* series similarly yielded an increase in blood volume, in the *third* series only, at the end of the injection period. In order to explain this discrepancy experiments were conducted with the purpose of investigating the fate of this carbohydrate in the organism (TERZIOĞLU and ERÖZ : this journal). Since in these experiments, 80-100 % of the subcutaneously injected sucrose was excreted in urine and since the variations in blood sugar level were within the normal range, the observed increase in total blood volume as well as in erythrocytes upon its administration cannot be due to an increase in the intermediary acid products of glucose metabolism, which stimulate the blood-forming organs into increased activity. The only other alternative would be the direct effect of the hypertonic solution itself on the bone marrow, stimulating it into erythropoietic activity as well as withdrawing fluid from the tissues into the blood stream. Thus in the writing of this manuscript, our attention was drawn to a recent article by EGGLETON (1947) who observed an increased acidity of urine and a decrease in its buffering output upon intravenous injections of hypertonic sucrose solution into men. He believes that this action of sucrose may be concerned with dehydration of tissues in general.

It seems difficult to account for the large variations in blood volume by mere differences in the constitution of the animals investigated. Since the calculation of the total amount of erythrocytes as well as of hemoglobin in blood are based upon the estimated blood volume values, it is of utmost importance to know as to whether any error may be present in the method of blood volume determination. So far, we are unaware of any technical errors, unless it be that the colloidal dye, Geigy-blue, may be adsorbed on some elements in blood stream; such as, the blood corpuscles or the blood proteins, or be retained in some part of the circulatory system, such as the spleen sinusoids.

Thus the adsorption of vital red on the red corpuscles of undiluted ox blood and, to a lesser extent, of dog' blood had been proved by LINDHARD (1925) in *in vitro* experiments. He showed that the hemo-

globin and the stroma of the cell have greater affinities for the dye than the red cell as a whole and, if therefore, some hemolysis occurs during the course of manipulation, the values estimated for plasma volume and consequently for blood volume would be too high. More recently still, our attention was drawn to an article (FREY, 1947) in the retention of methyl-violet and eosin dyes on capillary surfaces of the frog subsequent to its perfusion *via* the aorta by Ringer's containing these dyes.

Erythrocyte count and hemoglobin concentration. — In all rabbits of the *first* and *third* series, there was a large increase in erythrocyte count at the end of the injection period, although this was already revealed in the majority by the end of the second week. As was observed for the blood volume, the marked increase that occurred in erythrocyte count of some rabbits during the first two weeks was not sustained to the same extent during the latter half of the experimental period. Again, the "after-effect" of injections in inducing a further augmentation in red cell count was apparent two weeks after the termination of injections.

The change in hemoglobin concentration, though not as general and as marked as for erythrocytes, seemed to follow the same pattern of response. As to why in some animals, the early increase in blood volume, red cell count, and hemoglobin augmentation was not sustained throughout is difficult to explain. This may be because the initial change is of such a large magnitude that the animal is incapable of dealing with it efficiently and, as a result, a reduction down to the physiological optimum occurs. Again another question which would arise from these results is as to the cause of the observed "after-effect" of injections. This may be that the bone marrow was so stimulated, that instead of a regression to normal conditions upon the stoppage of injections, it continued to produce red cells and pour them into circulation. However, this new formation is very unlikely since it occurred even in some rabbits that were unresponsive or responded very little during the period of injections and since no such "after-effect" was observed for the reticulocytes. The only other alternative seems to be that the already-formed blood may be stored in the bone marrow or the spleen sinuses and be poured into the circulatory system only after the injections have been stopped.

The failure of hemoglobin concentration to increase to the same extent as the erythrocytes during the period of injections led to a decrease in color index. A similar reduction was noted by us in our earlier experiments (TERZIOĞLU, 1945) and was attributed to the lack of iron

in the diet of rabbits on the acid diet. Thus upon the administration of ferrous chloride to these animals, the color index rose to, or above unity. Both of these results indicate that the newly-formed red cell does not possess its full amount of hemoglobin, and that the latter is either formed from a pre-cursor within the cell while in the circulatory system or else is acquired elsewhere outside of the bone marrow. Thus this completion of the acquirement of hemoglobin outside of the bone marrow has been suggested in literature by several workers. ISOTOMANOWA (1930) claimed that all erythrocytes liberated from the marrow were reticulocytes, and that ripe red blood cells were not stored in bone marrow. Recently NIZET (1947), by labelling erythrocytes of one dog with phenylhydrazine and delivering them through crossed circulation into another, concluded that no ripe corpuscles are stored in the bone marrow, and that all red cells achieve their ripening in circulating blood. REIMANN (1942) who investigated the relation of reticulocytes to hemoglobin formation in cases of pernicious anemia noted that at least a third of the total quantity of hemoglobin normally present in blood is formed outside of the bone marrow, as demonstrated by *in vitro* experiments. In another paper (REIMANN, 1943) dealing with the same subject, REIMANN cited the reticular substance as the most probable seat of hemoglobin formation. According to him, this substance after having completed its task is expelled, as the nucleus, from the mature erythrocyte.

HEATH and DALAND (1930) similarly concluded that reticulocytes attain their maturation by loss of their reticular substances within the circulatory system. They incubated blood at various temperatures and made reticulocyte and erythrocyte counts at various intervals thereafter. They found that as the number of reticulocytes decreased, the total number of red blood cells in the incubated tubes remained the same.

Our results on the increase in the number of reticulocytes simultaneously with the decrease in color index in both types of acidosis, as induced by the feeding of an acidotic diet or by injection of glucose solutions, indirectly substantiate the hypotheses of the above workers in regard to the maturation of reticulocytes while within the circulatory system.

In conclusion, the results of the present experiments indicate that injections of hypertonic glucose as well as equimolar sucrose solutions stimulate regeneration in that an increase in total blood volume, erythrocyte and reticulocyte counts and hemoglobin concentrations is produced. Since according to experiments of ERÖZ and TERZIOĞLU, a reduction in alkali reserve as well as a diminution in blood- and urine pH values

was obtained with the same dosage of glucose administered, in the light of our previous findings (TERZIOĞLU, 1945), this blood-regenerating-effect of glucose was attributed to changes in the acid-base equilibrium of blood. The failure of rabbits in our *second* series to respond to glucose injections may seem to be in contradiction at first sight; but when one considers that little or no effect of glucose administration on the acid-base equilibrium of rabbits experimented upon during the same period was obtained, this paradox seems to be a strong evidence for our theory. However, the similar effect of sucrose solutions on blood regeneration cannot be attributed to changes in acid-base equilibrium since no reduction in alkali reserve upon the administration of this carbohydrate was obtained. Therefore the cause for regeneration under these conditions must be sought elsewhere.

SUMMARY

1) In the three series of experiments, arranged according to the season of experimentation, the effect of glucose acidosis, as induced by injections of a 25 % glucose solution in a daily dose of 2 grams of glucose per kilo of body weight, on blood regeneration has been investigated.

2) In the rabbits of the *first* and *third* series experimented upon in the winter and spring seasons, there was an increase in blood volume, by the end of the four week injection period as determined by the dye method, using colloidal dye Geigy-blue. Generally the increase in blood volume during the first two weeks was of a greater magnitude than that during the latter half of the period. Two to four weeks after the termination of injections, the blood volume was reduced to, or below normal in some of the rabbits, while in others an "after-effect" of injections in the nature of a further augmentation was observed.

3) It was found that in rabbits of the *first* and *third* series, there was a large augmentation in total erythrocyte count and hemoglobin concentration, though the increase for the latter, was not as general and as marked in extent as for the former. Just as it was observed for the blood volume, the marked increase in erythrocyte count and hemoglobin concentration during the first two weeks was not generally sustained to the same extent by the end of the fourth week. Moreover, in some of the rabbits the "after-effect" of injections in promoting a further erythropoiesis appeared two weeks after the termination of injections. Possible explanations are offered for these two observations common to

changes in blood volume, erythrocyte count, and hemoglobin concentration.

4) The finding that the increase in hemoglobin concentration was not of an equal magnitude as that for erythrocytes was further verified by the diminution in color index, under the conditions of glucose acidosis. This is attributed to the flooding of the circulatory system by immature red cells which do not possess the normal quota of hemoglobin, when the bone marrow is over-stimulated. Thus, the simultaneous increase in the number of reticulocytes of glucose-injected rabbits substantiates this attribution.

5) The increase in the total volume of blood as well as the red corpuscles in rabbits injected with a hypertonic glucose solution is attributed to changes brought about in the acid-base equilibrium of blood. Thus a reduction in alkali reserve, urine- and blood pH values has been observed (ERÖZ and TERZIOĞLU, 1949) when starved rabbits were injected with the same dosage of glucose as employed in the present experiments. Under the conditions of glucose acidosis so induced, the bone-marrow may be stimulated to over-activity by the increase of H-ions in the blood stream, as had been postulated for the interpretation of our previous results (TERZIOĞLU, 1945) on the effect of acid-producing diet on blood regeneration.

6) The results in the *second* series experimented upon during the hot months of June and July are in disagreement with those of the *first* and *third*, in that no effect of glucose administration on blood regeneration was observed in the former. Since similarly no significant variation in acid-base equilibrium of blood was obtained upon the administration of glucose to starved rabbits during this month, the lack of regeneration can be explained by the absence of acidosis and therefore of the stimulating-effect of H-ions on the bone marrow.

7) The control animals in the *first* series injected with isotonic-salt solution and those in the *second* injected with equimolar sucrose solution yielded no regeneration of blood. However, the control rabbits of the *third* series injected with an equimolar sucrose solution revealed some augmentation in blood volume as well as an increase in erythrocyte count and hemoglobin concentration. The possible causes for these changes due to sucrose administration are discussed.

The authors of the preceding and the present articles wish to express their gratitude and thanks to professor H. WINTERSTEIN for his valuable suggestions and criticisms along the progress of this work as well as in the writing of this manuscript. Thanks are also due to Mr. AYHAN SONGAR for helping with blood counts and hemoglobin determinations in the third series of experiments.

BIBLIOGRAPHY

1. — BECKMANN, K. *Ztschr. f. exp. Med.*, 1922, 29, 579-595.
2. — BERT, P. (1878), (1882) *cit.* HALDANE and PRIESTLEY "Respiration" and *cit.* LUFT, U. C., *Ergeb. d. Physiol.*, 1941, 44, 286-291.
3. — CAMPBELL and MALTBY. *J. Clin. Invest.*, 1928, 6, 303. *Cit.* SCHMIEDT, E., *Ztschr. f. exp. Med.*, 1935, 95, 288-294.
4. — DALWIG, H. C., A. KOLLS, and A. S. LOVENHART. *Am. J. Physiol.*, 1915, 39, 77.
5. — EGGLETON, M. C. *J. Physiol.*, 1947, 106, 456-465.
6. — ERÖZ, K and M. TERZIOĞLU. This Journal.
7. — FREY, E. *Klin. Wochenschrift*, 1947, 24-25/33-34, 528-531. Abstracted in *Excerpta Medica* (section on physiology, pharmacology, and biochemistry) 1, 1326.
8. — HEATH, C. W. and G. A. DALAND. *Arch. Int. Med.*, 1930, 46, 533-551.
9. — ISOTOMANOWA. *Ztschr. f. exp. Med.*, 1930, 79, 140.
10. — KURIYAMA. *J. biol. chem.*, 1918, 33, 215.
11. — LINDHARD, J. *Am. J. Physiol.*, 1926, 76, 497-507.
12. — MARKEES, S. and A. MENCZER. *Schweiz. med. Wochenschrift*, 1946, 76/1, 337-343.
13. — MILLER, Jr., A. T. *Am. J. Physiol.*, 1940, 129, 524-531.
14. — NIZET, A. *Quatr. J. Exp. Physiol.*, 1947, 34, 43.
15. — REIMANN, F. *Schw. Ztschr. f. Pathol. u. Bakteriolog.*, 1942, 5, 344-359.
16. — REIMANN, F. *Schw. Ztschr. f. Pathol. u. Bakteriolog.*, 1943, 6, 35-45.
17. — SOMOGYI, J. C. *Schweiz. med. Wochenschrift*, 1941, 22/1, 225-228.
18. — SOMOGYI, J. C., WIRZ, and F. VERZAR. „Höhenklima-Forschungen des Basler Physiologischen Institutes“, 1945, p. 53-59. Benno Schwabe & Co, Basel.
19. — TERZIOĞLU, M. *Revue de la Faculté des Sciences de l'Université d'Istanbul*, 1945, Serie B, X, 96-114.
20. — TERZIOĞLU, M. and K. ERÖZ. This Journal.
21. — WYMER, I. *Arch. klin. Chir.*, 1926, 143, 200-233.

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

SUR LA TOXICITÉ DE L'ALPHA-NAPHTYLE-THIOURÉE

PAR

A. BRION

(Travail reçu le 5-3-1949).

Nous nous sommes proposé dans le présent travail d'étudier l'action toxique de l'alpha-naphtyle-thiourée (Antu par abréviation) sur diverses espèces animales, au point de vue clinique et anatomo-pathologique, de façon à établir d'une part les doses mortelles, et d'autre part son mode d'action sur l'organisme.

On sait que l'Antu est préconisé depuis quelques années comme raticide. A cet égard il est employé sur une très large échelle en certains pays, aux U.S.A. notamment. Si l'on dispose d'amples renseignements sur les résultats pratiques obtenus par son emploi, en revanche, les doses toxiques exposées par certaines publications ne concordent pas toujours. D'autre part il n'existe, à notre connaissance, aucune étude histologique sur les lésions produites par ce corps, et qui peuvent expliquer comment il intoxique. Nos investigations ont porté, outre les rats, sur quelques espèces domestiques susceptibles de s'empoisonner expérimentalement, et sur les animaux de laboratoire. C'est le résultat de ces recherches que nous exposerons ici.

L'antu qui a servi à ce travail nous a aimablement été remis par Philips Electrical Co. Il est fabriqué par l'Aldan Chemical Co., Chester. U.S.A. Il s'agit d'une préparation commerciale renfermant 15 % d'Antu et 85 % d'excipient pulvérulent. Ce produit, qualifié Antu 15 %, est une poudre très fine, impalpable, gris bleuté, insoluble dans l'eau, mais formant avec les corps gras, et notamment les huiles végétales des suspensions homogènes stables. Il est inodore, et, pour l'homme, insipide. Nous verrons qu'il n'en est pas de même pour toutes les espèces animales.

1. — *Effets sur le Rat d'égoût ou Surmulot*
(*Mus decumanus, Rattus norvegicus*)

a) *Protocole expérimental.* — Les rats ont été capturés à la nasse dans les égoûts et dans les resserres des Halles de Lyon. L'Antu leur a été présenté de deux façons : en ingestion forcée ou sur des appâts (viande ou graisse imprégnées du toxique); et simplement déposé sur le sol. Quelques rats ont accepté les appâts sans aucune difficulté : il convient même de remarquer tout de suite, car ce point est important, qu'ils n'ont manifesté aucune réaction pouvant être provoquée par une sensation gustative désagréable. Il nous est même arrivé d'observer un rat qui léchait l'Antu qu'on lui présentait sur du coton hydrophile tenu à l'extrémité d'une pince, sans aucune substance alimentaire. Mais dans les autres cas, en raison de l'extrême réserve de ces animaux maintenus en captivité, nous avons été dans l'obligation de procéder à l'ingestion forcée.

Les rats sont sortis de la nasse, et placés dans un bocal de verre dans lequel on pulvérise du chlorure d'éthyle anesthésique. D'autre part, l'Antu est mis en suspension dans l'huile végétale, en quantité convenable selon le poids du rat. Aussitôt que l'anesthésie est obtenue, le rat est sorti du bocal, entravé avec des pinces, et, dès qu'il commence à sortir de son état d'hypnose, on lui injecte dans la bouche, avec une seringue, la quantité voulue d'huile chargée d'Antu-15 %. De cette façon, le réflexe pharyngien se produit normalement, et nous n'avons jamais noté de fausse déglutition, qui aurait amené des quintes de toux expulsive. Le réveil est complet quelques secondes après. Le rat est alors remis dans une cage grillagée.

Dans toutes les expériences, un rat est conservé comme témoin, et est soumis, lui aussi à l'anesthésie, de façon à éliminer la cause d'erreur qui viendrait de l'action toxique propre de l'anesthésique. En réalité, nous n'avons pas observé de lésions lentes, notamment hépatiques, dues au chlorure d'éthyle; mais dans un certain nombre de cas, des rats sont morts de syncope anesthésique.

Pour les expériences dites de contact, l'Antu est déposé sur une surface plate recouverte d'une cloche de verre. L'aération est réalisée sous la cloche par un courant d'air d'aspiration (tube relié à une trompe à vide) et une arrivée d'air frais; un récipient contenant du chlorure de calcium assure l'assèchement de l'atmosphère. Les rats se meuvent librement sous cette cloche.

b) *Expériences d'ingestion.* — Les rats qui ont ingéré de l'Antu présentent au bout d'une demi-heure à deux heures, de la somnolence. Ils cessent de se mouvoir, restent tapis en boule, la tête entre les membres antérieurs. Il réagissent aux excitations extérieures (bruit, approche d'un instrument, attouchement) par un réveil brutal qui les fait sauter, puis ils reprennent leur attitude somnolente. Ils ne manifestent plus d'agressivité pour l'homme, ou pour les objets qu'on met à leur portée. Sortis de leur cage, ils ne cherchent pas à s'enfuir, mais parcourant un léger trajet, ils retombent aussitôt dans leur sommeil. Au bout d'un temps variable avec la dose ingérée, les rats peuvent être laissés en liberté dans le laboratoire. Il semble que rien ne puisse les faire sortir de leur prostration. Le corps se couvre de sueurs, la respiration s'accélère. La mort survient après une période d'extrême difficulté respiratoire, avec ouverture de la bouche à l'inspiration, discordance, tirage présternal.

Le temps de survie, fonction de la dose, peut être résumé dans le tableau suivant :

Dose (en mg par kg de poids vif)	Survie
200	6-12 heures
120	12 heures
75	30-36 heures
30	36-42 heures
15	45 heures
10	plus de 42 heures (sacrifié pour récolte de tissus frais)
8,5	48 heures-survie (30 %)
5	survie (100 %)

En résumé, la *dose létale est de 10 mg par kilo de poids vif.*

Nous remarquerons que la plupart des auteurs déterminent la « dose létale médiane », c'est-à-dire la dose qui provoque une mortalité de 50 % des animaux intoxiqués. Le choix de cette unité ne nous paraît pas judicieux, car, non seulement il nécessite, pour chaque expérience, un grand nombre de sujets, mais encore il n'a pas d'intérêt pratique, puisque ce qui importe, c'est de connaître la dose qui tue sûrement le rat. Cette dose l'étale moyenne est inférieure à celle que nous déterminons comme dose toxique. Elle varie selon les auteurs, de 4,2 mg, à 6,9 mg par kilo.

Lesions. — Chez tous les sujets, quelle que soit la quantité de toxique administrée, on trouve de la *nécrose du foie*. Macroscopiquement l'organe

est parsemé de zones décolorées. L'examen microscopique montre des plages dans lesquelles le tissu hépatique est mort, ne prend pas la coloration et perd sa structure histologique. Certains sujets ont également de la congestion et des hémorragies hépatiques (FIG. 1).

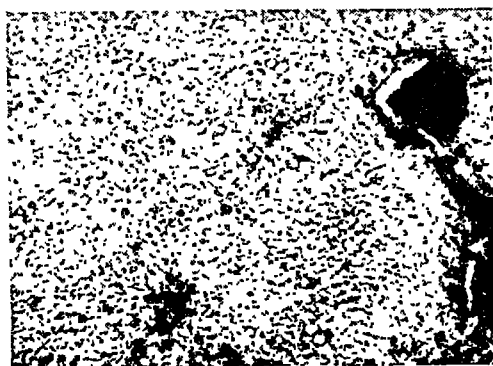


FIG. 1

Rat gris. — Nécrose du foie, congestion et hémorragies.



FIG. 2

Rat gris. — Oedème massif du poumon.

Toutes les fois que, en raison de la dose administrée, la mort est survenue tardivement, la cavité pleurale contient plusieurs centimètres cubes de liquide fournissant une réaction de Rivalta négative. Certaines zones du poumon sont atelectasiées, et surtout, il existe un *important œdème pulmonaire* qui remplit la presque totalité des alvéoles (FIG. 2). Déjà, à l'autopsie, on peut noter que du liquide séreux s'écoule de la trachée et des grosses bronches, soit spontanément, soit à la pression exercée sur le poumon.



FIG. 3

Rat gris. — Congestion et hémorragie de la muqueuse gastrique.

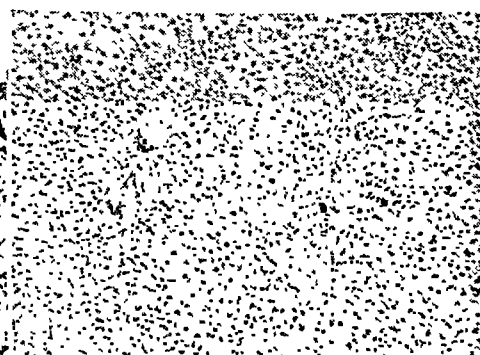


FIG. 4

Souris blanche. — Congestion hépatique.

Enfin, nous notons encore des hémorragies des réservoirs digestifs, surtout dans la partie antrale de l'estomac. Ces hémorragies, qui peuvent être profondes, se font jour vers la lumière de l'organe, et le sang, en grande partie transformé en magna noirâtre par les sucs digestifs est retrouvé dans le chyme récolté dans l'intestin, et jusque dans les excréments (FIG. 3).

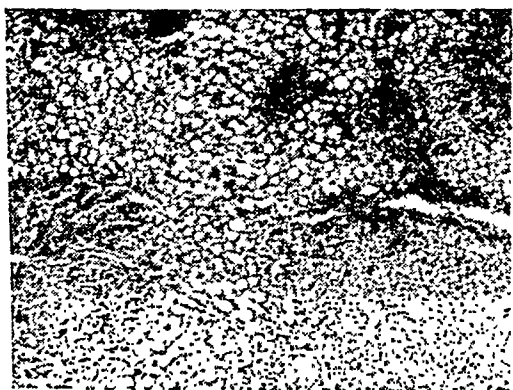


FIG. 5

Chat. — Dégénérescence graisseuse du foie.



FIG. 6

Poulet. — Congestion et hémorragies pulmonaires.

En somme, l'Antu provoque une vaso-dilatation aboutissant à des phénomènes congestifs et hémorragiques dans le tube digestif, le foie, le poumon, et à une exsudation séreuse dans le poumon et la plèvre. La somnolence que présentent les sujets est sans doute due à un œdème cérébral qui procède de la même cause. Le toxique détruit précocement le tissu hépatique, par voie de nécrose massive. Mais il est hors de doute que la mort est surtout le fait de l'asphyxie par hydro-pisie pleurale et œdème pulmonaire.

c) *Expériences de contact.* — Le rat gris ne manifeste aucune méfiance vis-à-vis de l'Antu déposé sur la surface où il se meut en liberté. En le piétinant, il s'en charge les pattes et les poils de la région inférieure du corps. Sans manifester de prurit violent, le rat, quelques minutes après, procède à sa toilette par léchage, et l'on peut alors noter qu'il absorbe l'Antu sans montrer l'inquiétude que provoquerait infailliblement une substance au goût désagréable. Les doses d'Antu ingérée sont ainsi toujours considérables car l'intoxication est rapide. La prostration commence au bout d'une demi-heure, et la mortalité, qui est de 100 %, se produit en moins de 26 heures.

Les lésions sont, naturellement, les mêmes que dans les expériences

d'ingestion : congestion, hémorragies, œdème du poumon et de la plèvre, nécrose du foie.

Le fait que le rat ne se méfie pas de l'Antu déposé sur le sol est intéressant au point de vue pratique puisqu'il permet d'atteindre ces animaux autrement que par des appâts qui ne sont pas toujours ingérés.

2. — Rat noir (*Mus rattus*, ou *rattus rattus*)

De l'avis de tous les auteurs, le rat noir, ou rat des greniers, est moins sensible à l'Antu que le rat gris.

Dans nos expériences les survies suivantes sont notées :

Dose (en mg par kg)	Survie
100	10-12 heures
50	10-12 heures
40	12-14 heures
20	15-18 heures
15	24 heures
12	48 heures-survie (60 %)

Les symptômes observés, ainsi que les lésions sont exactement les mêmes que pour le rat gris. L'Antu est à peine moins toxique puisque la dose létale est de 15 mg. par kilog.

3. — Souris blanche

Les expériences ont été conduites de la même façon. Les réactions sont quelque peu différentes. La souris intoxiquée présente bien les mêmes phénomènes de prostration, mais, ceux-ci sont entrecoupés de périodes d'excitation, pendant lesquelles l'animal saute, grimpe frénétiquement aux parois de la cage, s'agite en tous sens, tremble.

De plus, l'Antu provoque de vives démangeaisons sur les parties du corps où il a été déposé : pourtour de la bouche, pattes, ventre. La peau rougit fortement. L'animal se gratte, se frotte, se mord à ces endroits.

La survie s'établit comme suit, en fonction des doses :

Dose (en mg par kg)	Survie
375	5 heures
180	10 heures
120	18 à 25 heures
75	survie (100 %)

L'Antu est donc nettement moins toxique pour la souris blanche que pour les rats gris et noirs, puisqu'il faut compter sur une dose d'*au moins 100 mg. par kg. de poids vif*.

Les lésions sont différentes également. Nous n'avons jamais trouvé d'hydropisie pleurale, et l'œdème pulmonaire, quand il existe, est extrêmement discret et ne frappe que quelques alvéoles. Ce qui domine, c'est la congestion extrêmement vive, allant jusqu'à l'hémorragie, dans le foie, le poumon, l'estomac et l'intestin (FIG. 4).

Avec des doses faibles, quand l'intoxication est assez lente, on remarque de la dégénérescence graisseuse du foie.

4. — Cobaye

Le cobaye est doué d'une grande sensibilité gustative vis-à-vis de l'Antu, et quelles que soient les précautions prises, il se refuse à ingérer les appâts recouverts du produit. Affamé, il broute le pourtour de l'appât jusqu'aux endroits où la poudre a été déposée et, à partir de ce moment, s'abstient totalement.

L'intoxication, chez lui, se traduit, plus nettement encore que chez la souris, par de l'excitation : il court dans sa cage, saute, grimpe aux parois, retombe, agite les membres, retrouve difficilement son équilibre, pédale en décubitus latéral.

La dose toxique est de 100 mg. par kg.

Les lésions consistent surtout en congestion du poumon, du foie, de l'estomac, avec hémorragies, et en dégénérescence graisseuse du foie. Il n'y a pas d'œdème pulmonaire.

5. — Chien

La sensibilité du chien à l'action toxique de l'Antu est difficile à déterminer avec précision car cet animal vomit les appâts empoisonnés avec la plus grande facilité. Lorsqu'on lui administre moins de 200 mg. par kg. ce vomissement lui permet de se soustraire à l'intoxication. Il faut, par conséquent, des doses notablement plus élevées, de l'ordre de 500 mg. par kg., pour que, malgré le vomissement, il y ait absorption suffisante de toxique. Le chien perçoit également une odeur ou une saveur à l'Antu, et, spontanément, s'abstient d'en consommer.

Les symptômes consistent surtout en gastro-entérite et en polypnée.

A l'autopsie, on trouve, comme chez le rat, un léger hydrothorax, et de l'œdème très accentué du poumon. L'estomac et l'intestin sont vivement congestionnés. Le foie demeure normal, sans dégénérescence ni congestion.

6. — *Chat*

Chez le chat, l'Antu provoque essentiellement de la dégénérescence graisseuse aiguë massive du foie (FIG. 5). La presque totalité du parenchyme est lésée : ceci confirme une sensibilité d'espèce qui se manifeste vis-à-vis de très nombreux poisons et notamment de tous ceux qui renferment un noyau phénolique dans leur molécule.

Au contraire du chien, le chat ne vomit pas l'Antu qu'il a absorbé. L'intoxication se traduit par un état de torpeur typhique, sans symptômes respiratoires nets.

La dose toxique est supérieure à 150 mg. par kg.

Avec des doses allant de 160 à 200 mg., la mort survient dans un délai de 24 à 36 heures.

7. — *Poulet*

Le poulet est extrêmement résistant à l'Antu, ce qui confirme les constatations des auteurs américains, notamment de RICHTER et DIECKE. Il n'est tué qu'avec des doses de 1 g. par kg. Il résiste régulièrement à 500 mg. par kg. La mortalité est de 30 % avec 700 mg., 60 % avec 800 mg.

Les symptômes consistent dans la prostration : les animaux s'isolent, dorment, la tête basse, les plumes hérissées, refusent toute nourriture. Avec 1 et 2 g. par kg., la mort survient en 36 à 48 heures.

Le foie est atteint de dégénérescence graisseuse, et de congestion hémorragique. Le poumon présente de la congestion et des hémorragies dans les tubes aériens. Il n'y a pas d'œdème (FIG. 6).

CONCLUSIONS

La dose toxique d'Antu est établie de la façon suivante exprimée en mg. par kg. de poids vif :

Rat d'égout	10
Rat noir	15
Cobaye	100
Souris blanche	120
Chat	150
Chien	500
Poulet	1000

L'énorme différence entre les 2 espèces de rats sauvages et les autres animaux domestiques susceptibles de manger les appâts abandonnés est favorable à l'emploi de l'Antu comme raticide. Ce dernier provoque surtout, chez les rats et le chien un hydrothorax et de l'œdème pulmonaire; chez le chat et le poulet, de la dégénérescence graisseuse du foie; dans les autres espèces, des phénomènes congestifs et hémorragiques.

Les phénomènes de somnolence sont les plus importants parmi les symptômes que présentent les intoxiqués; en particulier, ils font perdre aux rats toute possibilité de fuite. Cependant, chez le cobaye, et la souris blanche, on remarque, sur un fond typhique, des crises d'hyperexcitabilité.

RESEARCH DEPARTMENT, DIVISION OF PHARMACOLOGY
CIBA PHARMACEUTICAL PRODUCTS, INC., SUMMIT, NEW JERSEY

KYMOGRAPHIC REGISTRATION OF CEREBROSPINAL FLUID PRESSURE (IN DOGS AND CATS): EFFECTS OF ANTIHISTAMINICS AND COMMON DRUGS THEREON ⁽¹⁾

BY

BRADFORD N. CRAVER, ANNE CAMERON AND JAMES SMITH

(Received for publication 28-2-1949).

An investigation was initiated to determine to what extent the effects of histamine upon the pressure of the cerebrospinal fluid (CSF) of the dog and cat could be modified by the antihistaminics, 2-(N-Phenyl-N-benzylaminomethyl)-imidazoline hydrochloride (Antistine) and N,N-Dimethyl-N'-benzyl-N'(alpha-pyridyl)-ethylenediamine monohydrochloride (Pyribenzamine), and to ascertain what effects the antihistaminics themselves might have upon the pressure. Since a brief survey of the literature failed to reveal a simple method for the continuous kymographic recording of CSF pressure it became necessary to improvise one. This is described below, for despite its simplicity, it is believed it may find application in other problems of neurophysiology. The study was subsequently extended to include the reactions of the drugs given in Table I. This extension of the study was made with the two-fold purpose of: 1) shedding some light on the causes of acute changes in the cerebrospinal fluid pressure by a study of the reactions elicited; 2) summarizing such studies as had previously been reported by others and attempting to explain some contradictions that had been encountered regarding the effects of certain drugs such as histamine.

⁽¹⁾ A preliminary report was presented at the 1948 meeting of the Federated Societies; *Fed. Proc.*, 7, 363, 1948.

METHOD

An ordinary U-tube glass manometer of 5 mm. internal diameter fitted with an elongated glass float 5 cm. in length proved sufficiently sensitive to record not only drug-induced changes in the CSF pressure, but also the slight changes of each respiratory cycle. The manometer was connected to the cisterna magna by rubber tubing attached through a three-way stopcock to a No. 18 or 20, 1 1/2 inch, short-beveled hypodermic needle. The needle with its stylet was thrust through the skin, subcutaneous fat and fascia and the stylet then removed. The three-way stopcock was then attached to the needle and adjusted to allow direct escape of the cerebrospinal fluid as soon as penetration had been effected. As soon as the cisterna magna had been penetrated, the stopcock was adjusted to connect the saline-filled manometric system with the cisterna magna via the needle. The stopcock was firmly held in place by a flexible lead clamp. In practice the cannulation was facilitated by flexing the animal's head on his chest and so maintaining it as he lay supine on the table. At the beginning of the experiment it was necessary to adjust the level of the fluid in the manometer either by altering its height or the volume of contained fluid so that the hydrostatic pressure of the fluid in the manometric system equalled that of the cerebrospinal fluid in the animal. The attainment of this end was evidenced by an unchanging height of the fluid in the manometer with a resultant horizontal recording. A good connection with the cisterna magna was usually evidenced by changes in the recording with each respiratory cycle. Inspiration caused little change but during expiration a rise followed by a fall was observed, as would have been anticipated from the effects of respiration on cerebral blood flow. This is in accordance with the changes reported by CARMICHAEL and his associates (1) and attributed by them to respiratory fluctuations in the cerebral arterial pressure. Figure 1 confirms the sensitivity of the method, since the expected rises and fall in CSF pressure from the injection of isotonic and hypertonic solutions respectively may be seen to have occurred.

RESULTS

In the dog Pyribenzamine usually caused a slight fall in the CSF pressure; the occasional rises were brief and minimal. On the other hand, Antistine did not alter this pressure. These effects upon CSF

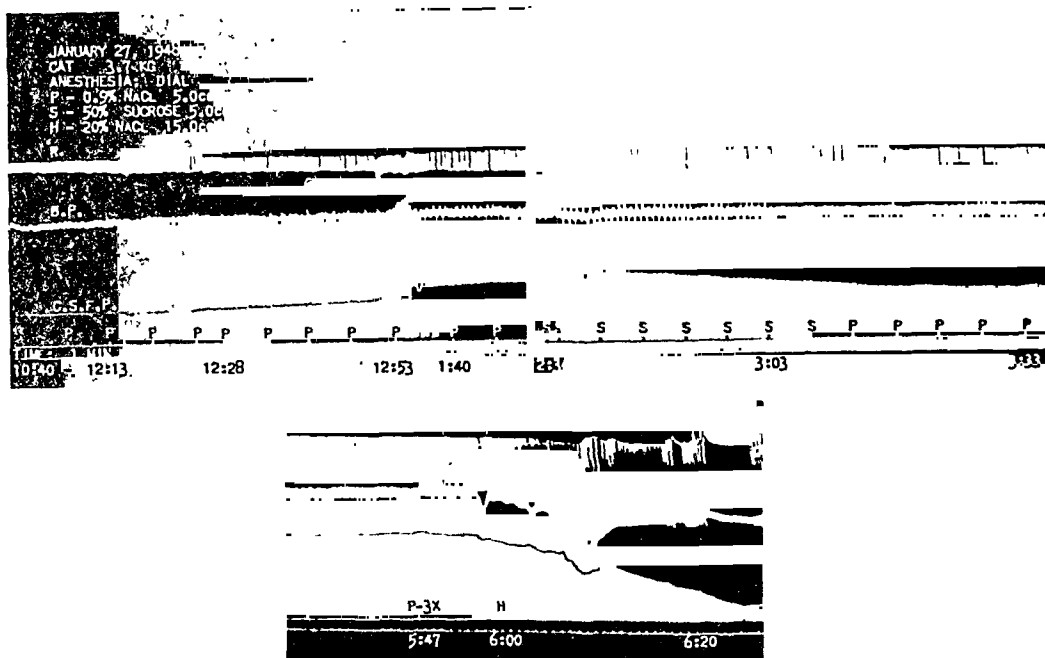


FIG. 1

This figure illustrates the sensitivity of the system to the injection of isotonic and hypertonic solutions which may be seen to have caused the expected rises and falls respectively in the CSF pressure. The dose of hypertonic saline which was purposely made large to emphasize its action may be seen temporarily to have caused marked cardiac inhibition.

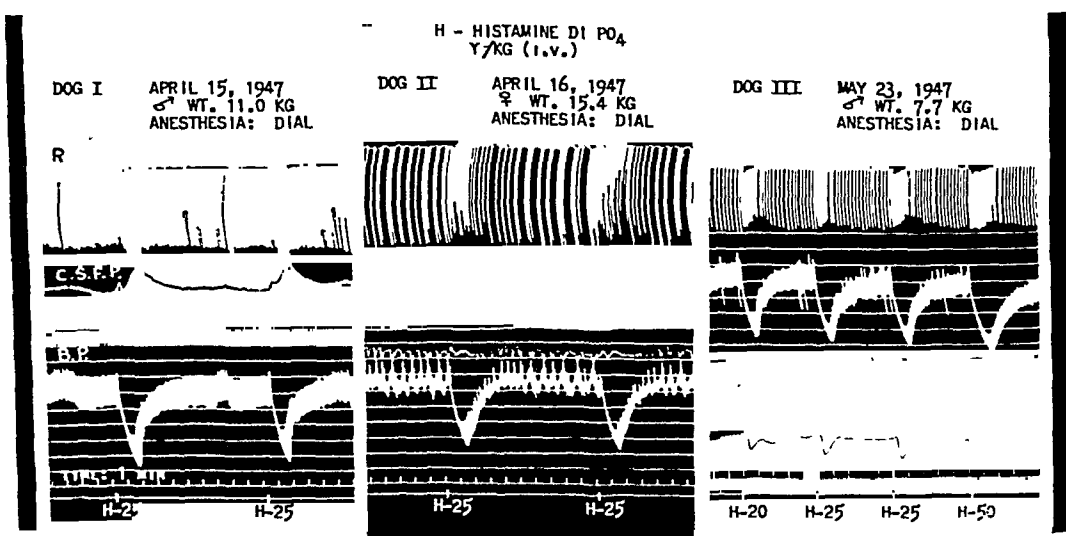


FIG. 2

This record illustrates the marked variations that may occur in the responses of the CSF pressure to injected histamine.

TABLE I

*Drug effects on arterial, venous, and cerebrospinal fluid pressures
Influence of anesthetics and species*

Nothing = O

Rise = R

Fall = F

Variable = V

Drugs i.v./kg. T.D. = Total Dose	Dial					Ether				Chloralose			
	CSF		Arterial		Ven.	CSF		Arterial		CSF		Arterial	
	dog	cat	dog	cat		dog	cat	dog	cat	dog	cat	dog	cat
Acetylcholine 10-25 γ	V		F			F	F	F	F	R	R	F	F
Aminophylline 2-10 mg.	F	F	F	F		F	F	R	F	R	R	F	F
Amyl NO ₂ inhaled	R	R	F	F									
Antistine 3-10 mg.	O		F		F	F	F	F	F	SL.R	R	F	F
Atropine 0.5-2 mg.	F		F			R	F	F	F	O-R	O	F	R
Caffeine 1-50 mg.	R	R	F	F		R	R	F	F	R	R	F	F
Ephedrine 0.1-0.5 mg.	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R
Epinephrine 0.25-10 γ	R F	R F	R F	R F	F	R F	R F	R F	R F	R F	R F	R F	R F
Ether inhaled	R	O	O	O	R					R	R	F	F
Histamine 1-250 γ	V	V	F	F		V	V	F	F	R	R	F	F
Papaverine 0.5-20 mg.	F		F			R	F	F	F	R	R	F	F
Physostigmine 0.1-0.2 mg.		R		F		R	O	F	F	O	O	F	F or R
Pituitrin-S 1 I.U. T.D.	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R
Priscol 10 mg.	R	R	F	F		F	F	F	F	R	R	F	F
Privine 10-200 γ	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R
Pyribenzamine 3-10 mg.	F	R	V	R		F	V	F	V	F	O	For R	O or R
NaCl 15 or 20 % 0.5-2 Gm.	F	F	O	F	R	F		R		F	R-F	R	F

pressure were observed despite the fact that both drugs usually caused moderate elevations of the blood pressure, probably because they were given slowly enough to avoid the hypotensive effect which the rapid injection of antihistaminics occasions. In the cat Pyribenzamine caused fairly marked elevations of the blood pressure and concomitant increases in the CSF pressure.

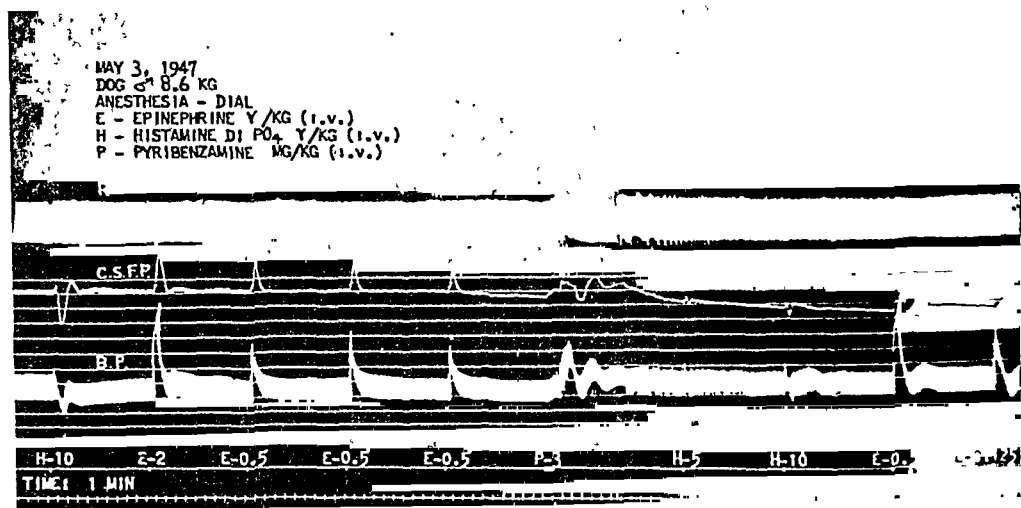


FIG. 3

This record illustrates: 1. the usual tendency of the CSF pressure to parallel the changes in blood pressure caused by an injected drug; 2. the potentiating action of an antihistaminic upon the pressor action of epinephrine without a corresponding potentiation of its action on the CSF pressure; 3. the inhibitory action exerted by an antihistaminic against the hypotensive effect of histamine.

The actions of histamine upon the CSF pressure were variable and unpredictable (FIG. 2), even though an effective dose of histamine always caused a fall in the blood pressure in both dogs and cats. At times it caused a monophasic rise or fall of the CSF pressure but more commonly a biphasic reaction with the initial phase usually a fall. In some experiments the reaction was even triphasic with an initial rise. Whatever the response to histamine, the antihistaminics antagonized it to about the same extent as they antagonized the hypotensive action of the histamine (FIG. 3).

Epinephrine usually caused parallel increases in both the blood pressure and CSF pressure but in some experiments a fall in the latter

pressure resulted despite a rise in the blood pressure. After the administration of an adrenolytic such as dibenzyl- β -chloroethylamine hydrochloride (Dibenamine) in sufficient doses to produce "epinephrine reversal", the effect upon the CSF pressure was invariably a fall (FIG. 4). The effects of the other drugs studied are summarized in Table I.

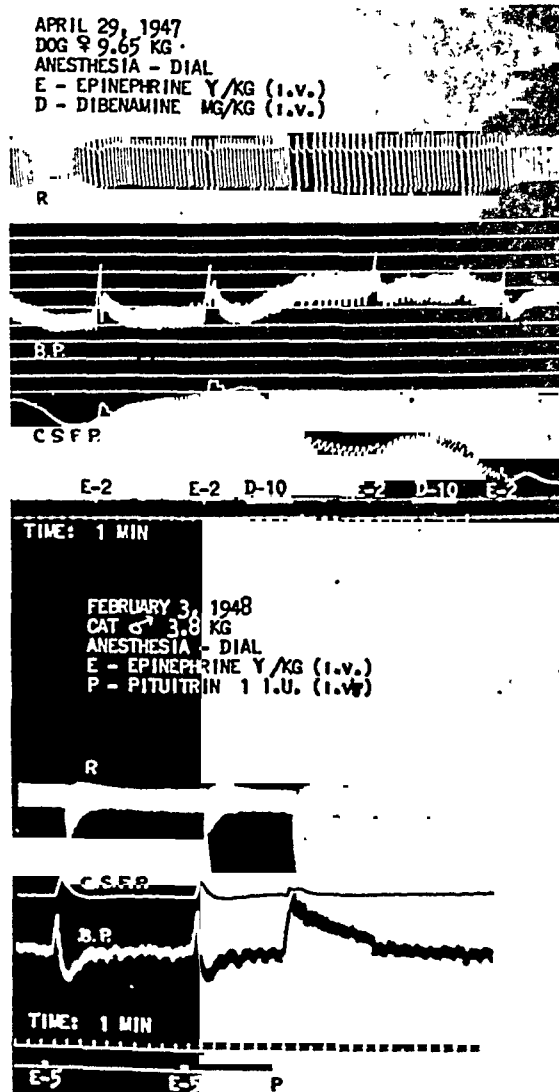


FIG. 4

The upper record shows that the effect of injected epinephrine upon the CSF pressure as well as its pressor action can be reversed by a potent adrenolytic. The sequence of events that may lead to syncope after the injection of any potent adrenolytic is also illustrated. The lower tracing illustrates the dissociation between the arterial and CSF pressures that was occasionally encountered.

DISCUSSION

The results in general accord with those of others, but histamine in this respect was a notable exception, which is not surprising in view of the wide variety of responses encountered in our own experiments. FORBES and his associates (2) reported that in etherized dogs histamine was most likely to lower the CSF pressure by decreasing the blood flow through cerebral vessels already dilated by the ether. A year later in 1930 LOEPER, LEMAIRE and PATEL (3) confirmed this result. WEINBERG (4) emphasized the state of anesthesia as determining the changes in CSF pressure of dogs to be expected from histamine. In unanesthetized animals a rise resulted, but in animals well anesthetized with sodium amytal or Phanodorn a fall was observed. NAGAYOSI (5), however, found in dogs and rabbits that histamine increased the CSF pressure. FRIEDMAN and THALE (6) studied the effects of histamine upon the CSF pressure of humans and encountered only increases. Our study of the effects of different anesthetics (Dial, ether and chloralose) upon the responses of the CSF pressure of dogs and cats clearly supports WEINBERG's conclusions as applied to some but not most drugs. For the most part, the responses of the CSF pressure to the same drugs were qualitatively akin irrespective of the anesthetic, but in some instances they were opposed. This was not unexpected for animals under chloralose anesthesia, since their vascular reflexes remain relatively unimpaired (FIG. 5). The responses of the CSF pressure to acetylcholine, histamine and 2-benzyl-imidazoline hydrochloride (Priscol) clearly demonstrate how reactions may vary with the anesthetic used. Thus, drugs causing hypotension and usually a concomitant change in the CSF pressure in animals anesthetized with Dial and ether, not infrequently produced a rise in the CSF pressure in animals anesthetized with chloralose, even though the hypotensive action remained. This was due presumably to unimpaired reflexes designed to maintain the cerebral circulation. These results may have clinical application in the choice of anesthetic for a patient with an elevated CSF pressure.

Amyl nitrite always caused a rise in the CSF pressure whenever it was administered in a sufficient dose to cause the usual fall in blood pressure. This agrees with the results reported by LOEPER, LEMAIRE and PATEL (7) in 1930 for the dog and subsequently confirmed by SUENAGA (8). STEFAN (9) reported that amyl nitrite had the same effect on the CSF pressure of humans.

Caffeine in these experiments invariably gave a rise in the CSF pressure

in both cats and dogs, attended by a moderate drop in the blood pressure, whereas DENKER (10) reported a marked, prolonged fall in the CSF pressure. Subsequently BLAU (11) reported inconstant, transient falls after caffeine. This probably reflects differences in anesthetics, doses and species.

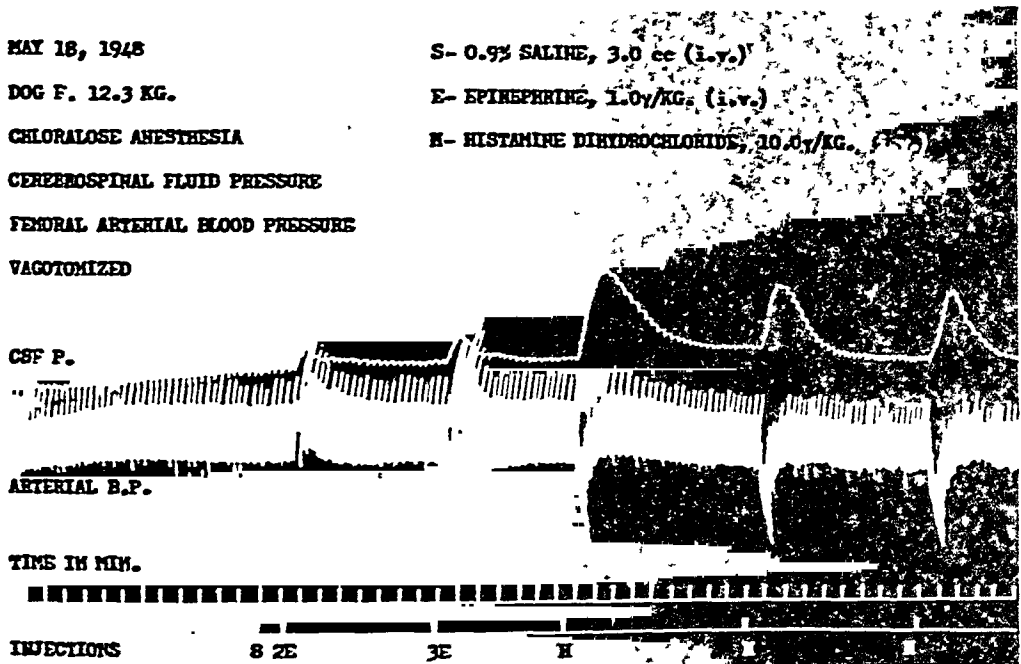


FIG. 5

The increase in CSF pressure caused by histamine injected into animals anesthetized with chloralose is illustrated. In animals so anesthetized, such increases were the rule, even after the administration of hypotensive drugs.

The effects of epinephrine accord in general with those previously reported. URECHIA and DRAGOMIR in 1928 (12) reported that epinephrine caused increases in the CSF pressure of humans. WEINBERG in 1933 (4) described similar responses in dogs and stated that they were independent of anesthesia. Subsequently NAGASIMI (13) and later NAGAYOSI (5) also observed rises in the CSF pressure of dogs after the administration of epinephrine.

Atropine caused variable changes in CSF pressure in our experiments in contrast to the rises reported by URECHIA and DRAGOMIR (12) for humans, by KAWAGUTI (14) for rabbits, and by NAGASIMI for dogs (13). These discrepancies are not surprising in view of the many variables that may alter the CSF pressure.

It is apparent that the CSF pressure did not always follow the changes in arterial pressure. In several experiments the cerebral venous pressure was simultaneously recorded via a catheter inserted cephalad into the jugular vein or by a "T" cannula inserted into the jugular vein allowing a continuous flow of blood while taking the recording. The changes in the venous and CSF pressures were often opposed.

Since in our experiments adrenolytics given in sufficient dosage to cause "epinephrine-reversal" caused concomitant reversals of the CSF effects of epinephrine, it suggests changes in CSF pressure are usually passive reflections of cerebral vascular changes. The tendency of hypotensive drugs to cause a rise in the CSF pressure under anesthesia with chloralose, which is known to cause minimal obtundation of the vascular reflexes designed to maintain the cerebral circulation, would offer additional support for this hypothesis.

Our experiments have therefore suggested to us that measurements of the CSF pressure are indirect measurements of cerebral blood volume, a hypothesis that could be indirectly tested by a correlation of direct measurements of cerebral blood flow with those of the CSF pressure.

SUMMARY

1) Histamine did not cause consistent changes in the CSF pressure. The effects caused were antagonized by the antihistaminics, Antistine and Pyribenzamine to about the same extent as the hypotensive actions of histamine.

2) In general the effects of the many drugs studied upon the CSF pressure paralleled their effects upon arterial blood pressure.

3) The type of anesthetic agent employed in an experiment sometimes exerted a marked influence upon the effects produced by the injection of a given drug.

4) Measurements of CSF pressure are possibly indirect measurements of cerebral blood volume.

5) These experiments have suggested no contraindication to the use of antihistaminic therapy in clinical conditions attended by an abnormally increased CSF pressure.

REFERENCES

1. — CARMICHAEL, E. A. *Lancet*, 1947, *II*, 804-5.
2. — FORBES, H. S., WOLFF, H. G. & COBB, S. *Am. J. Physiol.*, 1929, 89, 266.
3. — LOEPER, M., LEMAIRE, A. & PATEL, J. *Compt. rend. Soc. de biol.*, 1930, 103, 1187-9.
4. — WEINBERG, S. J. *J. Pharmacol. & Exper. Therap.*, 1933, 47, 95-106.
5. — NAGAYOSI, S. *Hukuoka Acta Med.*, 1941, 34, 312-34, (39-40 in German). (CA 36 : 1988, 1942).
6. — FRIEDMAN, E. & THALE, T. *Arch. Neurol. & Psychiat.*, 1943, 49, 449-53.
7. — LOEPER, M., LEMAIRE, A. & PATEL, J. *Compt. rend. Soc. de biol.*, 1930, 103, 1186-7.
8. — SUENAGA, T. *Kumamoto Igakkai Zasshi*, 1937, 13, 51-64, 883-96, (CA, 1938, 32, 8588).
9. — STEFAN, H. *Klin. Wchnschr.*, 1934, 13, 1858-9.
10. — DENKER, P. G. *Am. J. M. Sc.*, 1931, 181, 675-81.
11. — BLAU, A. *Arch. Int. Med.*, 1936, 57, 749.
12. — URECHIA, C. I. & DRAGOMIR, L. *Compt. rend. Soc. de biol.*, 1928, 99, 1069-71.
13. — NAGASIMI, S. *Chiba Igakkai Zasshi*, 1938, 16, 1777 (CA, 1940, 34, 7421).
14. — KAWAGUTI, K. *Nagoya Igakkai Zasshi*, 1937, 46, 245 (CA, 1939, 33, 3467).

FROM THE DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY CHARLES IVTH UNIVERSITY
PRAGUE. DIRECTOR : PROFESSOR B. POLÁK

A PHARMACOLOGICAL ANALYSIS OF THE O-TOLYLETHER OF GLYCEROL

BY

HELENA RAŠKOVÁ AND ZDENĚK VOTAVA

(Received for publication 19-2-1949).

The introduction of curare in modern therapeutics involves a large amount of chemical and biological research to find new synthetic compounds with therapeutic properties equivalent to curare but without its untoward effects.

The investigation of substituted ethers of glycerol led BERGER and BRADLEY to the introduction of Myanesin, the *o*-tolylether of glycerol, in place of curare as a relaxing compound in anesthesia. BERGER from the beginning, however, brought evidence, that the site of action of the drug is not at the neuromuscular junction as with curare, but in the spinal cord. The clinical application of the drug in anesthesia and neurology yealded optimistic reports (MALLINSON et al.) but also severe criticism (HALE ENDERBY and others), because in some cases hemoglobinuria occurred after the intravenous administration of the drug. Recently, the drug has been tried perorally for the treatment of spastic and hyperkinetic disorders (BERGER and SCHWARTZ). It seemed to us that a further pharmacological analysis could add new points besides confirming some results.

Partly original Myanesin (BDH), in injections, partly *o*-tolylether of glycerol were used in our experiments. The compound is poorly soluble in water. We dissolved it in 3,5 parts of water, 3,5 parts of glycerol and 1 part of ethylalcohol.

Toxicity tests.

BERGER and BRADLEY performed a series of toxicity tests. In tests for acute toxicity they did not use rats. After intravenous injections

in this species in our experiments the median lethal dose (LD_{50}) was 338 mg/kg (KÄRBER). The results are very close to the 322 mg/kg for mice obtained by British authors using the same route of administration. Also the corresponding paralysing doses PD_{50} 169 and 150 mg/kg are very similar.

Our results after intraperitoneal administration of *o*-tolylether of glycerol to mice in the DL_{50} differ from BERGERS results. He found

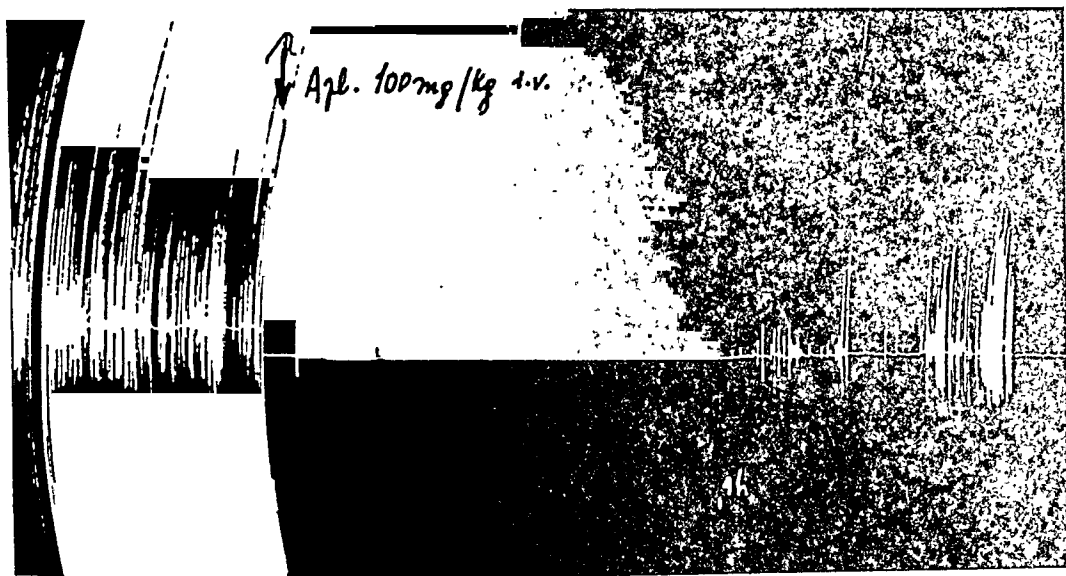


FIG. 1

Rat in the motility cage. At the arrow 100 mg of the drug were given. 1 h. indicates 1 hour after the administration.

610 mg/kg, we only 356 mg/kg. The PD_{50} , however, are again very close 170 and 178 mg/kg respectively. Besides various animal strains different solvents may cause this difference.

The clinical picture after increasing doses was also described by BERGER and BRADLEY. But our experiments added some new points. In rats a dose of 100 mg/kg causes a partial paralysis of the hindlegs and a moderate increase in respiratory rates. 130 mg/kg produces a still incomplete paralysis 2 minutes after the injection. In some cases *blood appears in the urine*, 220 mg/kg produces a complete paralysis for 20 minutes, or more, the respiratory curve is flat. As a rule blood is present in the urine. With still higher doses the same picture is maintained but the paralysis lasts for longer periods. (280 mg/kg for 2-3 hours). Hemoglobin is always found in the centrifugated urine, some animals die.

Rabbits show after the administration of about 40 mg/kg the "head

drop sign". Complete paralysis occurred after 70 mg/kg. The lethal zone starts from 200 mg/kg. High doses change the type of respiration into diaphragmatic and sometimes apnoic pauses are seen. The corneal reflexes remain positive, after high doses the reflex is \pm . From the dose 175 mg/kg hemoglobine is always present in the urine. In doses from 175-200 mg/kg paralysis is preceded by tonic convulsive movements. After 1-2 hours, when the animal recovers, muscular tremors sometimes occur.

In all animal species used, higher doses always produce hemoglobinuria. BERGER and BRADLEY did not describe this in their experimental paper. There are, however, clinical reports of this complication in clinical practice (LOFTUS DALE, PUGH and ENDERBY et al).

Recently some authors suggested that hemolysis and hemoglobinuria could be caused by the solvents and not by the drug itself. (HEWER, WILSON et al.).

Motility cages for rats and mice are a good method for the registration of the duration of paralysis. The movements of 4 animals in 4 cages were recorded simultaneously on a very slowly revolving long paper drum.

In mice 25 mg/kg does not cause any alteration in motility. 50 mg/kg lowers the movements of mice for 25-30 minutes. After 100 mg/kg administered intravenously there is a complete loss motility for more than one hour. After the administration of 150 mg/kg the animal is completely immobile for $1\frac{1}{2}$ -2 hours, but even after 4 hours normal motility is not yet reached (FIG. 1).

The action on the heart, circulation and respiration.

In the frog's heart (SYMES preparation) the height of the contraction is decreased after concentrations 1 : 20.000. The individual results however showed considerable quantitative variation, because the experiments were performed in Spring. But from the concentration 1 : 8000 a regular slowing of the heart rhythm occurred and eventually the heart stopped. Even the changes after high concentrations of 1 : 2000 were reversible after washing out.

20 mg added to the perfusion fluid of the Langendorff preparation of the rabbits heart stopped the beat of the heart. 10 mg added to the bath perfusion fluid of the isolated rabbits heart auricles (perfused at 29° C) lowers the concentration. 25 mg of the drug decreases the height of the contraction very considerably. (Volume of the bath 100 ccm). The addition of 5 microgrammes of acetylcholine causes a

summation of both depressions (FIG. 2). The changes of blood pressure after the administration of the *o*-tolylether of glycerol were followed in anesthetised rabbits, cats, dogs and in spinal cats. In some experiments on cats and dogs the respiration (GADDUMS method) the movements of the gut and the volume changes of the kidney (oncography) were also followed.

In rabbits 1,25 g urethane/kg was used as anesthetic. Even such small doses as 4 mg/kg of the *o*-tolylether of glycerol showed a small fall in blood pressure after rapid administration. Exceptionally a dose of 8 mg/kg caused a large fall in blood pressure (More than 40 mm Hg). There is an almost linear relationship between dose and fall of blood pressure in rabbits. Doses which

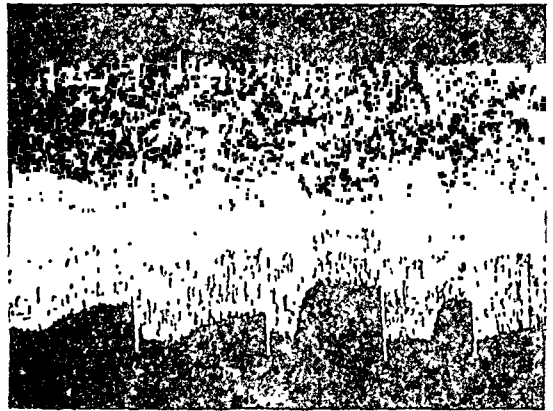


FIG. 2

Isolated auricles of the rabbits heart perfused at 29° C with Ringer-Locke solution. M = Myanesin. Ach = acetylcholin.

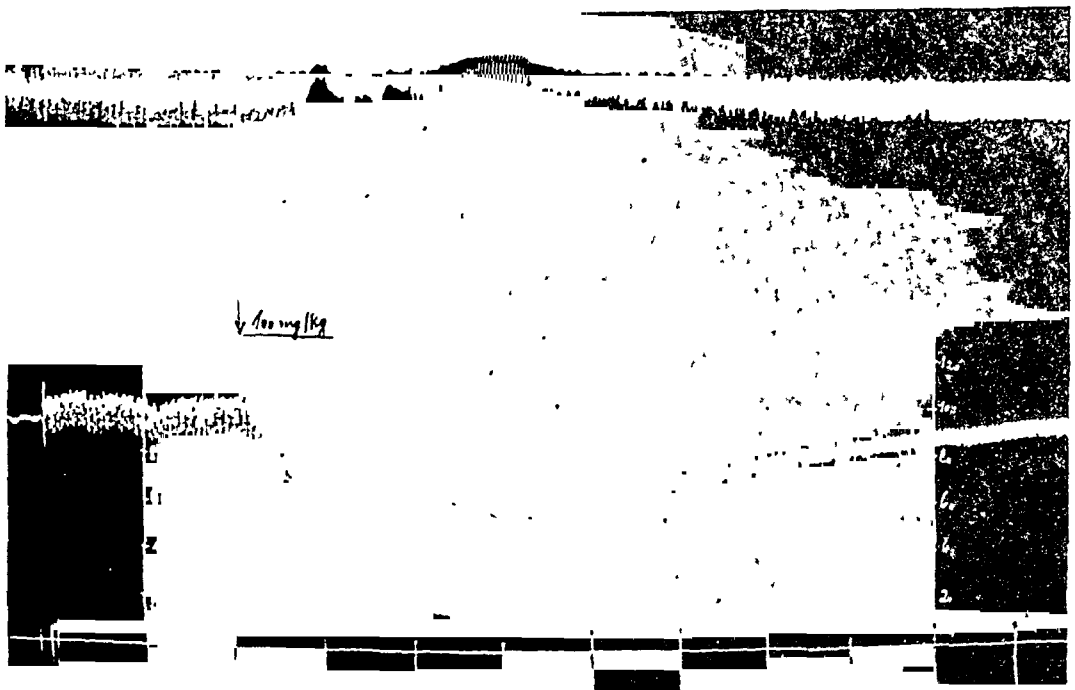


FIG. 3

Rabbit. Urethane 1,25 g/kg. From above respiration, blood pressure, time in minutes. At the arrow 100 mg of *o*-tolylether of glycerol was injected into the auricular vein.

approach 100 mg/kg cause even after a slow administration a transient fall almost to zero (FIG. 3). Some doses were administered intravenously through the jugular vein some through the marginal auricular vein. Higher doses also alter the respiration, which becomes flat and after a temporary acceleration the frequency is less.

In unanesthetized rabbits the volume and frequency of respiration was measured by a spirometer. Higher doses administered by the intravenous route into the marginal vein of the ear make again the respiration flat, sometimes increase the frequency and often cause irregularity.

In cats very small doses do not alter the blood pressure so constantly as in rabbits, the vegetative mechanisms play their influence. But doses of 20 mg/kg after a rapid intravenous administration into the jugular vein cause again a typical transient depression of the blood pressure. In dogs the rapid administration of 20 mg/kg causes also a typical transient fall of blood pressure. But the blood pressure remains for a long period a little lower than it was before the administration. The respiration is flat and sometimes after rapid administration even stops for a moment (Vagal effect?). There is a marked vasodilatation of the kidney and a relaxation of the gut.

All this occurs only after rapid administration. The same dose slowly given does not cause any alteration except a flat respiratory

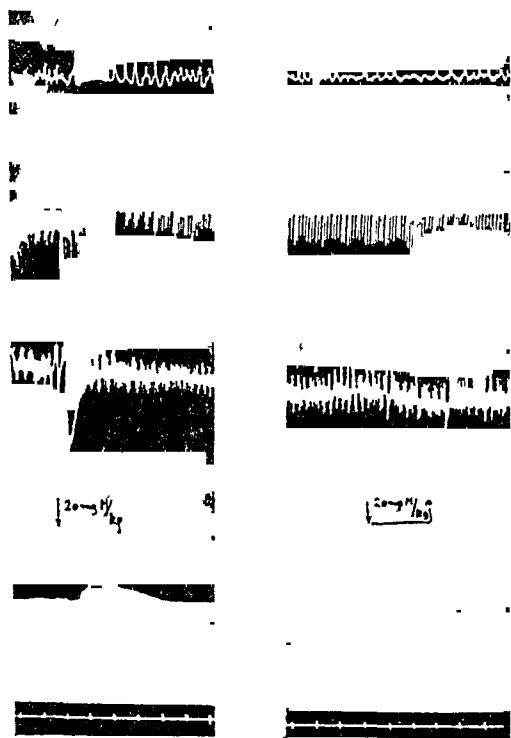


FIG. 4

Dog, 5,5 kg. Chloralose 0,08/kg.

From above: Movements of the gut, respiration, blood pressure, changes in the volume of the kidney (oncographic), stimulation signal, time in minutes. In the first part 20 mg/kg of *o*-tolylether of glycerol were rapidly injected, in the second within 2 minutes. All injections into the jugular vein.

curve. Higher doses (40 mg/kg) cause a great fall of blood pressure, over 60 mm Hg, in dogs, but again it recovers within a few minutes (FIG. 4).

The fall of the blood pressure is not influenced by the elimination of

the higher centers in spinal cats (FIG. 5). The dose effect relationship is again almost linear.

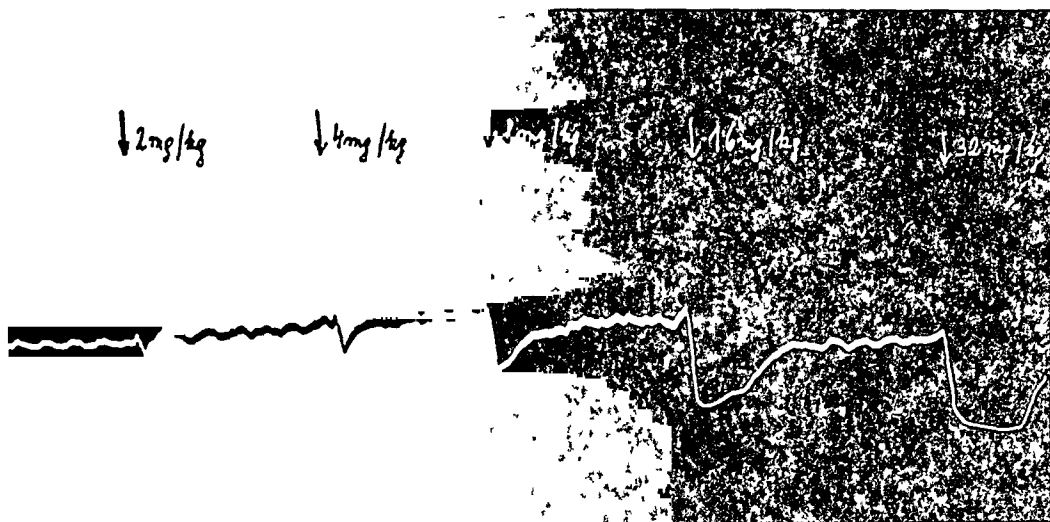


FIG. 5

Spinal cat 3100 g. At the arrows the corresponding doses of *o*-tolyether of glycerol were rapidly injected into the jugular vein and washed with 1 ccm of saline.

20 mg of the drug added in 0,2 ccm volume to the perfusion fluid of the isolated rabbits vessels ear preparation (method of GADDUM and KWIATKOWSKI) causes also a marked vasodilatation (FIG. 6).

All these effects show, that the *o*-tolyether of glycerol has not only a central action on the blood pressure as suggested by BERGER and MALLINSON, but there is also a direct peripheral action. The adrenaline response of the blood pressure of the spinal cat is partially or completely abolished by different doses of the *o*-tolyether of glycerol. 20 mg/kg causes a partial inhibition of 10 microgrammes of adrenaline, 50 mg/kg abolish it (FIG. 7).

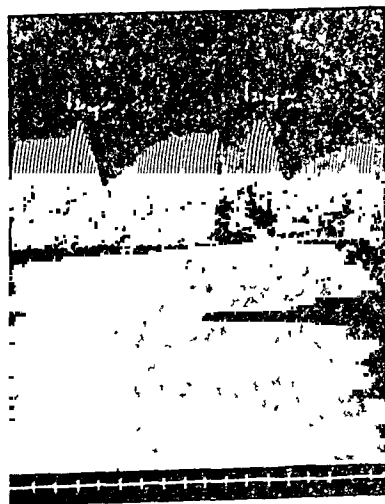


FIG. 6

Isolated vessels of the rabbits ear, (Method of GADDUM and KWIATKOWSKI). The vessels were perfused through the carotid artery, the perfusion fluid was collected from the jugular vein. The registration was made with GADDUM's drop-timer. On the ordinate the interval between drops was registred.

Acetylcholine increases the blood pressure fall of the drug. Atropinised animals, however, have the same blood pressure changes as normal ones. The effect on the blood pressure is not the result of cholinergic stimulation (muscarine type).

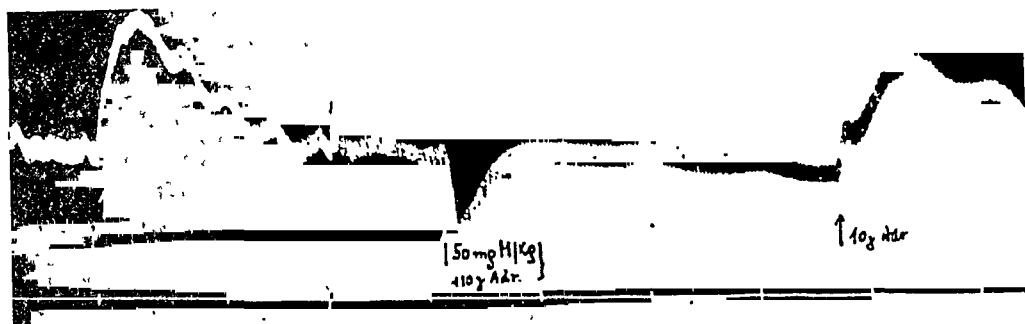


FIG. 7

Spinal cat. At the first arrow 10 g of adrenaline were injected into the jugular vein. At the second arrow 50 mg of *o*-tolylether of glycerol (M) and immediately after it 10 g of adrenaline were injected. After 5 minutes again 10 g of adrenaline were injected. The response was still inhibited.

Effect on the isolated gut and uterus.

A concentration of 1 : 20,000 lowers the tonus of the isolated rabbits duodenum. A relaxation of dogs intestines in vivo was seen. The drug has also an antihistaminic potency tested on the isolated intestine of the guinea pig. 20 mg abolish the effect of 5 microgrammes of histamine.

25 mg of the drug depresses the movements of the isolated strip of the rabbits uterus. For about 10 minutes after washing out, the adrenaline contraction of the isolated uterus is also abolished, then the reactivity returns slowly (FIG. 8).

The local anesthetic activity as tested previously by BERGER and BRADLEY was confirmed (Method of BÜLBRING and WAJDA).

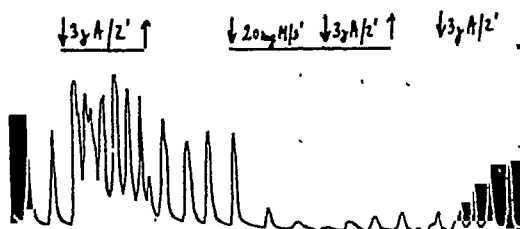


FIG. 8

Isolated strip of rabbits uterus, perfused with Ringer Locke at 37° C. A = adrenaline, M = *o*-tolylether of glycerol.

The numbers indicate the time, the drugs were left in the bath before washing out.

Curare-like activity.

The drug as previously stated and also as found by BERGER and BRADLEY produces a positive "head drop" test in rabbits. BERGER and BRADLEY thought muscle nerve preparations unsuitable for the testing of curare-like activity, because they thought that the local anesthetic activity could have a direct influence on the nerve.

We used the rats diaphragm preparation of BÜLBRING stimulated through the phrenic nerve and determined if any changes in the spike of the nerve occur after the administration of the drug.

A decrease in the height of the maximal muscle contraction occurs after 20-30 mg of the drug added to the bath. 150 mg cause complete paralysis. 200-500 times lower doses of curare produce the same effects (FIG. 9).

50 mg of *o*-tolylether of glycerol added to the bath cause a considerable diminution of the contractions

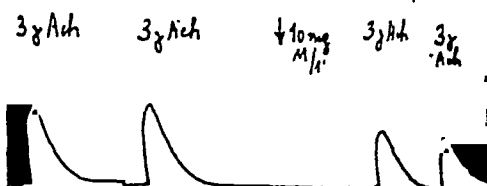


FIG. 10

Cat, blood pressure and respiration recorded on one drum, the contractions of the gastrocnemius muscle recorded with an isometric lever on the second drum. Ach = acetylcholine, M = the *o*-tolylether of glycerol, the first dose of acetylcholine was injected 1 minute after the *o*-tolylether of glycerol. All injections were made in the volume 0,5 ccm.

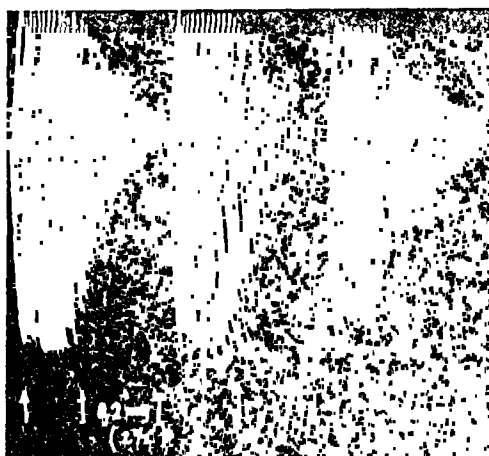


FIG. 9

Isolated rats diaphragm with phrenic nerve perfused at 37° C with Tyrode solution containing double the amount of glucose. Oxygen was supplied in fine bubbles. The muscle was stimulated indirectly to a maximal contractions 12 times a minute. T = tubocurarinchloride, M = *o*-tolylether of glycerol. The drug was given every 12th minute for 2,5-3 minutes, then it was washed out twice.

within 2-3 minutes. The spike of the phrenic nerve after 4-6 minutes was unchanged using the same dosage. The curare-like activity on the rat diaphragm preparation starts in lower doses, then the lethal range. The decrease of the acetylcholine response of the frog rectus muscle after curare led Garcia de Jalon to the introduction of a method for curare testing based on this fact. The *o*-tolylether of glycerol, however, produces a contraction of the muscle in doses 1 : 1000 and even smaller doses, which do not cause this con-

traction, increase the acetylcholine response of the frog rectus muscle.

A more suitable method for the detecting of changes in the acetylcholine response of the striated muscle is the denervated gastrocnemius preparation of the cat, where the acetylcholine contraction of the gastrocnemius muscle is caused by intra-arterial injections of acetylcholine into the opposite iliac artery toward the bifurcation of the aorta.

25 mg of *o*-tolylether of glycerol injected in the same manner, abolish completely the acetylcholine contraction of the muscle.

10 mg diminish it considerably (FIG. 10).

Indirect stimulation of the gastrocnemius is diminished only after high doses of Myanesin (50-100 mg) administered by the same route as before.

From these experiments it seems that the *o*-tolylether of glycerol influences the myoneural junction in higher doses, but these are not yet in the lethal zone.

The *o*-tolylether of glycerol is poorly soluble in water. We thought it therefore interesting to determine to what extent its properties may be influenced by different solvents. We analysed some pharmacological properties of the following solvents :

1) 3,5 parts of water, 3,5 parts of glycerol, 1 part of alcohol (R). This solvent was used for most of our experiments with the *o*-tolylether of glycerol.

2) Glycerol in water 75 : 105 (G).

3) Alcohol in water 30 : 175 (A).

4) Ethylenglycol in water 50 : 60 (E).

5) Ethylenglycol + ethylalcohol in water 20 : 90 : 90 (RE).

8 ccm/kg of any solvent administered to rats intravenously is well tolerated. This corresponds to 800 mg/kg of a 10 % solution of the *o*-tolylether of glycerol. This quantity is well above the LD₁₀₀. Extremely high volume doses of the solvent R (20 ccm/kg) were in the LD₅₀ range and caused convulsions. No blood was seen in the urine.

The solvent RE caused no convulsions, but paralysis, introduced by muscular tremor and most of the animals died. All had blood in the urine. E was less toxic and more animals survived. But within 30 minutes after the administration blood occurred in the urine. A had the lowest toxicity and no blood occurred in the urine.

Action of the solvents on the isolated frogs heart, the isolated gut and isolated uterus.

The contraction of the isolated frogs heart were lowered by the R, A, and RE solvents in doses corresponding to 100 mg of a 10 % solution

of the *o*-tolylether of glycerol. G primarily lowered and secondarily increased the beat in the same dose, E increased it.

Again in the same dose the solvents R and G lowered a little the spontaneous contractions of the isolated rabbits uterus but did not alter the adrenaline response. The solvents E and RE did not cause any changes and A increased a little the spontaneous contractions.

The solvent R contributes by 20-30 % to the depression of the contraction of the rat diaphragm preparation.

No solvent causes any spontaneous contraction of the frog rectus muscle. The acetylcholine contraction is not changed by the solvent G., the solvents A and R increase a little the contraction, the solvents E and RE increase the acetylcholine contractions in a considerable way.

DISCUSSION

The muscle paralysing action of the *o*-tolylether of glycerol consists besides its central origin, which was demonstrated by BERGER and BRADLEY also in a peripheral factor. 50 mg of Myanesin had a curare-like activity on the rats diaphragm, 100 mg produced a total paralysis within 1 minute. The spike of the nerve remained unchanged for 4-6 minutes. Also the acetylcholine response of the gastrocnemius muscle was lowered by 10-25 mg of the drug, when this was given as well as acetylcholine by the close intra-arterial route. These experiments show that although present only in higher doses the peripheral effect on the muscle has also some importance.

The changes in blood pressure occurring after the intravenous administration of the drug, when the interference of the higher centers is excluded and the vasodilatation of the perfused of the rabbits ear show that the drug has a peripheral action on blood vessels. The drug has also a depressing action on frog as well as the mammalian heart, when used in higher doses. The action of adrenaline on the blood pressure as well as on the isolated uterus of the rabbit is antagonised. The drug is not only paralysing for striated muscles but also lowers the tonus of smooth muscle organs (uterus, gut) in higher doses. A direct action in higher doses is produced on isolated guts and uterie.

The blood pressure fall may after a rapid administration of small doses be considerable

A very considerable inconvenience of the drug is the regularly occurring hemoglobinuria after higher doses. This was confirmed in several animal species.

The analysis of several solvents showed that ethylen-glycol in high doses caused blood to appear in the urine. The glycerol solvent may contribute to the changes on the rat diaphragm but except the diethylen-glycol solvents, the hemoglobinuria and vasodilatation in the kidney is caused by the drug itself.

We hope that our experiments may contribute to the explanation of some untoward effects which sometimes occur after the intravenous administration of the *o*-tolylether of glycerol in man.

SUMMARY

The *o*-tolylether of glycerol has besides its muscle paralysing activity a vasodilating action, partly of peripheral origin. The drug lowers the tonus of the isolated gut and rabbits uterus. It inhibits adrenaline responses of the blood pressure and isolated rabbits uterus. After higher doses hemoglobinuria occurs as a rule in various animal species. No solvent containing ethylen-glycol should be used because it produces hemoglobinuria in higher doses.

We are indebted to Mr. ŠICHO from the United Pharmaceutical Works in Prague for the synthesis and supply of the compound. Our thanks are also due to Miss L. VEJVODOVÁ and Mrs. VITKOVÁ for technical assistance, to Mr. ŠÍP from the Department of Pharmacology for the construction of the motility cages and to Dr. HOLUBAR from the Department of Physiology for the spike determinations.

REFERENCES

- BERGER, F. M. *Quart. Journ. Pharmacol.*, 1947, 20, 94.
BERGER, F. M. *Brit. Journ. Pharmacol.*, 1947, 2, 241.
BERGER, F. M. *Lancet*, 1948, 1, 651.
BERGER, F. M. and BRADLEY, W. *Brit. Journ. Pharmacol.*, 1946, 1, 265.
BERGER, F. M. and SCHWARTZ, R. P. *JAMA*, 1948, 137, 772.
BÜLBRING, E. *Brit. Journ. Pharmacol.*, 1946, 1, 38.
T. C. CHOU. *Brit. Journ. Pharmacol.*, 1947, 2, 1.
GADDUM, J. H. *Journ. Physiol.*, 1941, 99, 257.
GADDUM, J. H. and KWIATKOWSKI. *Journ. Physiol.*, 1938, 94, 87.
GARCIA DE JALON. *Quart. Journ. Pharmacol.*, 1947, 20, 28.
MALLINSON. Proceedings of the R. Soc. of Med., Vol. 41, Nr. 9, August 1948.
VAN DEN OOSTENDE, A. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1948, 75, 419.
PUGH ENDERLY. Proc. of the Royal Soc. of Med., Vol. 41, Nr. 9, August 1948.

UNIVERSITÉ DE LIÈGE. INSTITUT DE CLINIQUE ET DE PATHOLOGIE MÉDICALES
PROFESSEUR J. ROSKAM

SUBSTANCES THIOLOPRIVES ET HÉMOSTASE SPONTANÉE (*With Summary*)

PAR

JEAN HUGUES ET HENRI VAN CAUWENBERG

(*Travail reçu le 9-3-1949*).

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, l'utilisation de substances protéiques purifiées a permis de grands progrès dans l'étude de la coagulation sanguine. Parmi les travaux les plus importants, une attention particulière doit être attachée aux recherches de BAUMBERGER (3) et de LYONS (6) qui mettent en évidence le rôle des groupes thiols dans la transformation du fibrinogène en fibrine. Les expériences de LYONS démontrent que ce phénomène s'effectue en deux stades: dans le premier, libération des groupes -SH dissimulés du fibrinogène; dans le second, oxydation de ces groupes et apparition de ponts disulfures, opération correspondant à la précipitation de la fibrine.

JENNER (5), par après, montre que les corps appelés par BACQ (2) « thioloprives », c'est-à-dire susceptibles de former des complexes avec les groupes thiols, possèdent une action inhibitrice sur la coagulation sanguine.

Le but de ce travail a été d'établir l'éventuelle importance des groupes -SH dans le mécanisme de l'hémostase et l'influence de substances thioloprives diverses sur ce phénomène.

TECHNIQUE

Nous avons utilisé la technique de détermination du temps de saignement sous eau courante, au niveau de l'oreille du lapin, imaginée par ROSKAM (7). Les résultats ont été interprétés suivant la méthode statistique qui a fait l'objet du travail de ROSKAM et PAUWEN (9).

Les substances thioloprives utilisées dans nos expériences ont été introduites dans le liquide de lavage, après détermination, au niveau d'une oreille, du temps de saignement moyen témoin. La concentration des substances actives dans le liquide de lavage varie de 1/1000 à 5/1000.

RÉSULTATS

Les substances thioloprives utilisées, très diverses au point de vue chimique, furent : l'arsénite de potasse neutralisé (à la concentration de 5/1000 dans le liquide de lavage), le sublimé (5/1000), le dichloréthylsulfone ou sulfone d'ypérite (1/1000) et l'isothiocyanate d'allyl (à saturation dans le liquide de lavage, c'est-à-dire environ 1/1000).

Le pH de nos solutions était, grâce à un système de tampons, maintenu à 7.4.

Des expériences ont également été réalisées avec des corps non doués de propriétés thioloprives tels que le 2. 3 dimercaptopropanol ou B.A.L. (1/1000) et la combinaison de ce dernier produit avec le dichloréthylsulfone (1/1000).

Les résultats détaillés de ces expériences sont fournis ci-dessous. La figure 1 représente schématiquement la variation moyenne du temps de saignement pour chaque corps étudié.

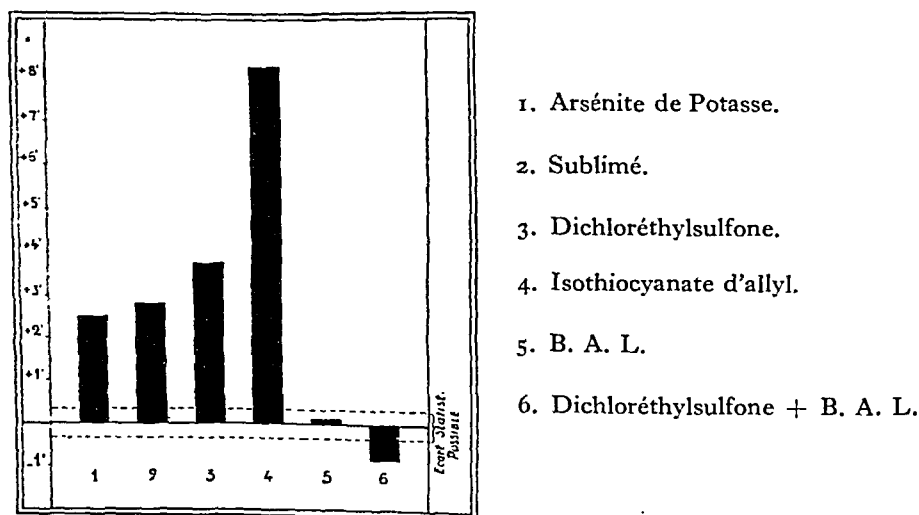


FIG. 1

Arsénite de Potasse : Allongement moyen du temps de saignement de 3'24" à 5'54", soit une variation moyenne de + 2'30".

(Variation par expérience : + 3'20", + 4'15", + 1'11", + 1'17").

Sublimé : Allongement moyen du temps de saignement de 3'04'' à 5'51'', soit une variation moyenne de + 2'47''.

(Variation par expérience : + 2'43'', + 2'13'', + 2'28'', + 3'47'').

Dichloréthylsulfone : Allongement moyen du temps de saignement de 3'25'' à 7'8'', soit une variation moyenne de 3'43''.

(Variation par expérience : + 5'54'', + 3'17'', - 2'18'', - 3'24'').

Isothiocynate d'allyl : Allongement moyen du temps de saignement de 3'6'' à 11'21'', soit une variation moyenne de + 8'15''.

(Variation par expérience : + 9'31'', + 12'50'', - 4'52'', - 5'49'').

B. A. L. : Allongement moyen du temps de saignement de 3'2'' à 3'8'', soit une variation moyenne de + 6''.

(Variation par expérience : + 7'', + 18'', - 13'', - 15'').

Dichloréthylsulfone + *B. A. L.* : Abaissement du temps de saignement de 3'29'' à 2'42'', soit une variation moyenne de - 47''.

(Variation par expérience : - 29'', - 89'', - 76'', + 3'').

DISCUSSION

Nos expériences montrent que les substances thioloprives utilisées retardent considérablement l'arrêt des hémorragies.

Très diverses au point de vue chimique, l'arsénite de potasse, le sublimé, la dichloréthylsulfone et l'isothiocyanate d'allyl ne possèdent en commun, aux concentrations utilisées, qu'une seule propriété : celle de bloquer les groupes -SH de certaines protéines. Il est donc naturel de rattacher à cette propriété leur action sur l'hémostase. La disparition de l'action inhibitrice sur l'hémostase de la dichloréthylsulfone une fois combinée au B.A.L., qui en sature les propriétés thioloprives, est un nouvel argument en faveur de cette hypothèse.

Rappelons que dans nos expériences, les substances thioloprives ont été utilisées en application locale. On ne peut donc, pour expliquer leur influence sur l'arrêt des saignements, invoquer le mécanisme suggéré par SMITH (10) et ALLEN (1) dans leurs recherches sur les états hémorragipares au cours des traitements par dérivés de l'ypérite ou par irradiation. Chez les animaux ainsi traités, ces auteurs repèrent l'apparition dans le sang d'une substance analogue à l'héparine, responsable, d'après eux, des saignements profus observés dans ces circonstances.

Parmi les substances que nous avons utilisées, celle qui retarde le plus l'arrêt des hémorragies est l'isothiocyanate d'allyl. Le mécanisme d'action de ce corps, qui s'avéra un vaso-dilatateur puissant, est vraisemblablement double : vaso-moteur en dilatant les vaisseaux et en

empêchant sans doute les vaso-constrictions si fréquentes au cours des traumatismes vasculaires, chimique en retardant la précipitation de la fibrine. Les saignements profus auxquels il conduit relèveraient donc de cette pathogénie mixte, vasculo-sanguine, sur laquelle ROSKAM (8) a attiré l'attention.

Des recherches actuellement en cours et comportant l'observation microscopique des hémorragies provoquées au niveau des petits vaisseaux du mésentère chez le lapin, nous ont montré que le clou hémostatique se forme dans le même délai au niveau des plaies irriguées avec une substance thioloprive qu'au niveau des plaies observées dans des conditions normales. Dans les deux cas, le volume et l'aspect du thrombus sont identiques.

Mais le clou hémostatique, même volumineux, formé sous l'influence d'une substance thioloprive, est incapable d'arrêter rapidement un saignement, parfois même, rend les hémorragies absolument incoercibles : il se laisse aisément traverser de part en part par le courant sanguin, comme si un défaut de sa texture interne le rendait perméable au sang. Nous pensons que ce défaut consiste en une insuffisance de précipitation de fibrine entre les éléments figurés qui le constituent.

CONCLUSIONS

Il semble donc que nous puissions conclure de nos expériences que les groupes thiols jouent un rôle important dans le mécanisme de l'hémostase normale : le blocage de ces groupes retarde considérablement l'arrêt des hémorragies.

RÉSUMÉ

Le T. S. du lapin, mesuré par la technique du lavage des plaies, est accru dans de fortes proportions par l'arsénite de potasse, le sublimé, le dichloréthylsulfone et, surtout, l'isothiocyanate d'allyl ajoutés au liquide laveur. L'addition conjointe à ce liquide de dichloréthylsulfone et de B. A. L. est, par contre, dépourvue de toute action prolongeante sur le T. S. Il semble en conséquence que le blocage des groupes thiols par ces corps retarde l'arrêt des hémorragies.

SUMMARY

The bleeding time of the rabbit is significantly increased when potassium arsenite, mercury bichloride, dichlorethylsulfone and, chiefly, allylisothiocyanate are added to the washings of wounds. The simultaneous addition of dichlorethylsulfone and B.A.L. does not prolong the bleeding time. It seems consequently that -SH blockade by those drugs delays haemostasis.

BIBLIOGRAPHIE

1. — ALLEN, J. G. et JACOBSON, L. *Science*, 1947, CV, 388.
2. — BACQ, Z. M. Substances thioloprives, *Experientia*, 1946, Vol. II/9, 10.
3. — BAUMBERGER, J. P. *American J. Physiol.*, 1941, CXXXIII, 206.
4. — FAUTYL, P. et M. H. NANCE. *Nature*, (London), 1947, CLIX, 777.
5. — JENNER, R. *Experientia*, 1947, III, 243.
6. — LYONS, R. N. *Austr. J. of Ex. Biol. and med. Sciences*, 1945, XXIII, 130.
7. — ROSKAM, J. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, CXII, 1245-1248.
8. — ROSKAM, J. *Arch. Intern. Pharmacodyn. et Thérap.*, 1945, LXXI, 389-410.
9. — ROSKAM, J. et PAUWEN, L. *Arch. Intern. Pharmacodyn. et Thérap.*, 1937, LVII, 450-466.
10. — SMITH, T. R. *Science*, 1948, CVII, 474.
11. — ZUCKER, M. B. *Proc. Exp. Biol. and Med.*, 1946, LXII, 245.
12. — ZUCKER, M. B. *Am. J. Physiol.*, 1947, CXXXVIII, 275.

ISTITUTO DI FARMACOLOGIA DELL'UNIVERSITÀ DI TORINO
DIRETTORE PROF. MARIO CHIÒ

RICERCHE SUL MECCANISMO D'AZIONE DEI DIGITALICI

II. Effetti metabolici della uabaina

(*With Summary*)

DI

GIORGIO SEGRE

(*Manoscritto ricevuto il 15-3-1949*).

In una mia precedente pubblicazione (1) è stata posta l'ipotesi che i digitalici agiscano quali trasportatori d'idrogeno e che quindi influenzino alcune reazioni enzimatiche fondamentali, particolarmente quelle legate alla presenza del difosfopiridinnucleotide e, dati gli stretti rapporti fra deidrogenazioni e fosforilizzazioni, quelle connesse con la formazione e l'utilizzazione di composti fosforati ricchi di energia. Il ruolo essenziale che a questi ultimi spetta in ogni prestazione energetica cellulare ha infatti di recente richiamato l'attenzione sulle possibili interferenze dei digitalici nelle reazioni cui tali composti fosforati partecipano.

Ricerche sull'influenza dei digitalici sulle fosfatasi (a parte quelle di COVELLO (2) che riguardano l'inibizione della scissione del β -glicero-fosfato da parte della fosfatasi renale) sono state condotte da KIMURA e DU BOIS (3), i quali hanno provato che strofantina e digitossina inibiscono l'adenosintrifosfatasi, ed altri processi di defosforilizzazione non catalizzati da questo enzima; e da ABDON e NIELSEN (4), i quali osservarono che la scissione enzimatica della fosfocreatina in vitro è lievemente rallentata dalla strofantina e che quest'ultima potenza notevolmente l'inibizione prodotta dall'acetilcolina.

GUERRA e Coll. poi, (5), hanno dimostrato che la liberazione di fosfati inorganici nel sistema miosina-adenosintrifosfato sodico è accelerata dalla uabaina, e suppongono che questo fenomeno costituisca il meccanismo d'azione dei digitalici, data la funzione preminente che nella contrazione muscolare esercitano sia la miosina che l'adenosintrifosfato.

Queste osservazioni, anche se non tutte inquadrabili nello stesso schema, porterebbero notevole luce sul problema del meccanismo

d'azione dei digitalici, se venisse decisamente dimostrato che la variazione di tali composti fosforati ha un ruolo essenziale nel meccanismo biochimico della insufficienza cardiaca. Le ricerche condotte a tale riguardo da WEICKER (6), secondo le quali nel cuore isolato, sia in stato di ipodinamia che di ipossia, si ha una diminuzione della fosfocreatina (F. C.) e dell'acido adenosintrifosforico (A. T. F.), e si ha un loro ritorno alla norma ad opera dei digitalici, sono state recentemente contraddette da WOLLENBERGER (7), il quale afferma che tali composti non avrebbero un'importanza particolare nella biochimica dello scompenso, dato che la loro concentrazione nel cuore non si modifica nello scompenso artificialmente indotto, e che le diminuzioni riscontrate da WEICKER sono da attribuirsi all'uso di soluzioni saline come liquido di perfusione e non si presentano nella perfusione con sangue.

Si può dire che i numerosi tentativi fatti per ricondurre la genesi biochimica dello scompenso ad una caduta della concentrazione dell'A. T. F. e della F. C. non sono sin'ora riusciti a chiarire la questione. Da una parte BURNS e CRUIKSHANK (8), oltre a WEICKER, sostengono un rapporto tra affaticamento cardiaco e perdita di A. T. F., e SCHUMANN (9) e CHANG (10) affermano che l'ipossia produce una perdita di A. T. F. e di F. C., in maniera reversibile, e che l'attività cardiaca varia approssimativamente con la concentrazione della F. C. (vedasi KATZ) (11); anche GRAUER (12) recentemente ha rilevato tale rapporto tra anossia e A. T. F.; altri autori sostengono invece che, anche in condizioni sfavorevoli di funzionalità cardiaca, non varia sensibilmente la concentrazione della F. C. (VISSCHER, 13; POLLAK, 14; CLARK, 15) e dell'A. T. F. (WOLLENBERGER, 7). Il problema è complicato anche dal fatto che vi è una relazione tra concentrazione di F. C. e frequenza cardiaca (WOLLENBERGER, 7) e che quindi tutte le cause che variano la frequenza del cuore, ne variano pure, per questo solo fatto, il contenuto in F. C.

WOLLENBERGER ha potuto recentemente (16) dimostrare nel preparato cuore-polmoni che la uabaina e la digitossina non producono modificazioni del contenuto in A. T. F. e F. C., se non a concentrazioni tossiche; si ha allora una notevole diminuzione di F. C., dovuta a rallentata sintesi, o ad accelerata scissione di A. T. F., o ad entrambi i processi contemporaneamente; secondo WOLLENBERGER, l'aumentata scissione di A. T. F. potrebbe aversi anche durante lo stadio non tossico, e non si manifesterebbe, per un aumento dei processi di fosforilizzazione.

WOLLENBERGER (7) interpreterebbe inoltre l'effetto inotropico positivo dei digitalici come dovuto non ad una loro azione sul metabolismo energetico, ma sul meccanismo di utilizzazione dei composti fosforati ricchi di energia. Tuttavia contro tale opinione si possono citare le

osservazioni di EISMAYER e QUINCKE (17) e di GREMELS (18), secondo cui il ritorno alla norma, per opera dei digitalici, dell'alterato metabolismo del cuore reso insufficiente, precede l'effetto meccanico; del pari WEDD e BLAIR (19) fanno notare che l'aumento della contrattilità miocardica prodotta dai digitalici è successivo al migliorare della lesione biochimica.

Poichè il problema dei rapporti tra digitalici e composti fosforati ricchi di energia offre ancora notevoli incertezze, e si presenta d'altra parte di primaria importanza nello studio del meccanismo d'azione dei digitalici, ho ricercato nel presente lavoro le variazioni prodotte dalla uabaina, durante l'incubazione di omogenati di muscoli di cavia, in quelle sostanze che rappresentano le tappe principali del metabolismo glicidico (glicogeno, glucosio, acido lattico, ac. piruvico), tenendo in particolare conto le frazioni fosforate (A.T.F., F.C., esosofosfati, fosforo inorganico), in modo da avere un quadro complessivo della serie dei processi della glicolisi e da poter eventualmente dedurre il punto o i punti di interferenza dei digitalici.

E' da tener presente che, come ha dimostrato POTTER (20), gli omogenati possono dare reazioni ossidative accoppiate con sintesi di fosfati ricchi di energia. L'impiego degli omogenati permette poi di escludere che le modificazioni metaboliche osservate siano secondarie a variazioni funzionali (si ricordi quanto si è detto dei rapporti tra frequenza cardiaca e contenuto in F. C.), o siano dovute al modificato tono del sistema autonomo.

METODO

Le prove sono state eseguite con uabaina a concentrazione di $1 \cdot 10^{-6}$ $1 \cdot 10^{-5}$; $1 \cdot 10^{-4}$. Si sono effettuate dieci prove per ogni concentrazione di uabaina, ed ognuna è stata condotta in doppio. Per ogni prova si usava una cavia del peso di circa 350 gr., che veniva uccisa con un colpo al capo, e da cui si prelevavano rapidamente circa 20 gr. di muscoli; questi erano omogenizzati a 0° C., secondo la tecnica di POTTER ed ELVEHJEM (21) usando un liquido della seguente composizione: NaCl 0,8%, KCl 0,02%, CaCl_2 0,02% MgCl_2 0,005%, NaH_2PO_4 0,005%, NaHCO_3 0,02%, glucosio 0,1%, pH 7,5. L'omogenato appena preparato veniva centrifugato a bassa velocità per separare le parti in sospensione, la cui presenza dà luogo ad una rapida scissione di A. T. F. Nell'omogenato il tessuto muscolare risultava infine diluito circa 7 volte, il che spiega i valori proporzionalmente bassi ottenuti in alcune frazioni. Le prove erano eseguite in termostato ad acqua, alla temperatura di 37,5° C,

con agitazione continua dei recipienti contenenti l'omogenato, in equilibrio gassoso con l'aria.

La deproteinizzazione era eseguita con ac. tricloroacetico a 0° C., in modo da averne una concentrazione finale del 4 %. Le operazioni per la determinazione delle frazioni fosforate venivano eseguite a 0° C.

Le determinazioni eseguite sono le seguenti :

glicogeno : metodo di PFLÜGER, secondo GOOD, KRAMER e SOMOGY (22);

glucoso : metodo di HAGEDORN e JENSEN;

acido lattico : metodo di CHARNAS e VON FÜRTH;

acido piruvico : metodo di BUEDING e WORTIS, con lettura al colorimetro Leifo, filtro 520.

fosfati : metodo di BRIGGS, con lettura al colorimetro Hellige.

Le varie frazioni fosforate sono state determinate secondo il metodo di KAPLAN e GREENBERG (23), basato sulla separazione in fosfati bario-solubili e bario-insolubili. Si indica con P_7 e P_{30} rispettivamente il fosforo inorganico determinato nella frazione bario-insolubile dopo idrolisi in HCl N a 100° C. per 7 e per 30 minuti, con P_0 il valore iniziale corrispondente al fosforo inorganico « vero », con P_{7-0} e P_{30-7} la differenza tra P_7 e P_0 e tra P_{30} e P_7 , corrispondenti il primo all'idrolisi dell'A. T. F. e il secondo all'idrolisi dell'esosodifosfato (cfr. WEITZER) (24) (1); dei fosfati bario-solubili la fosfocreatina è stata determinata per idrolisi a temperatura ambiente per trenta minuti in presenza di molibdato d'ammonio in H_2SO_4 N, e il glucoso-1-fosfato come quella parte della frazione di fosforo alcol-insolubile idrolizzata in dieci minuti in HCl N a 100° C. (v. UMBREIT, BURRIS e STAUFFER, 25).

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica secondo il test « t » di STUDENT, indicando la loro significatività con il valore « P » corrispondente (v. FISHER, 26) : si considerano convenzionalmente significativi quei valori corrispondenti ad un « P » non superiore a 0,05.

RISULTATI

Dai risultati raccolti nella tabella si può notare che negli omogenati si ha, accanto ai fenomeni glicolitici, una sintesi dei composti fosforati ricchi di energia (ATF e FC); il glicogeno è scisso rapidamente anche in presenza di glucoso allo 0,1 %, segno che negli omogenati prevalgono a questo riguardo i processi di scissione su quelli di resintesi. La scissione

(1) In tali condizioni l'esosodifosfato si idrolizza per circa il 50 %, come dimostrano le curve di LOHMANN (48).

del glicogeno è accentuata dalla uabaina, in maniera proporzionale alla concentrazione di quest'ultima. La formazione di glucosio in eccesso rispetto alla quantità presente prima dell'incubazione fa supporre una notevole attività fosfatasica, con scissione di parte dei vari esteri esofosforici. La quantità di glucosio che così compare, subisce notevoli variazioni da prova a prova tanto che le differenze dovute alla uabaina non appaiono significative ($\langle P \rangle = 0,4 - 0,7$). Si ha inoltre in presenza di uabaina una diminuzione del glucosio-1-fosfato ed un aumento dell'esodifosfato. Per concentrazioni di uabaina di $1 \cdot 10^{-6}$ l'acido lattico compare in misura leggermente superiore e l'acido piruvico in quantità lievemente inferiore rispetto al controllo; a concentrazioni maggiori si ha il fenomeno opposto, ed il rapporto ac. lattico/ac. piruvico risulta abbassato.

In presenza di uabaina i fosfati inorganici compaiono in quantità maggiore rispetto al controllo, proporzionalmente alla concentrazione di uabaina; pure proporzionale alla concentrazione di uabaina è la diminuzione di ATF e di FC. Determinazioni eseguite a parte, e non riportate, del fosforo acidosolubile totale non dimostrano variazioni apprezzabili tra controllo e saggio con uabaina, mentre un lieve aumento si ha tra il valore iniziale ed il controllo.

	Glicogeno	Glucosio	Glucosio-1-fosfato	Esodifosfato (P_{30-7})	Acido lattico	Acido piruvico	Fosforo inorganico (P_0)	Adenosintrifosfato ($P_{7,0}$)	Fosfocreatina
	mg. %	mg. %	mg. P %	mg. P %	mg. %	mg. %	mg. %	mg. P %	mg. P %
Valore iniziale	63	124	0.8	0.8	19.0	0.5	12.0	2.6	1.0
Controllo	46	137	0.6	1.0	17.0	1.0	13.0	4.6	1.2
Uabaina $1 \cdot 10^{-6}$	42	138	0.5	1.1	18.0	0.9	14.0	3.0	1.1
differenza %	-8	—	-16	+10	+6	-10	+7	-35	-8
« P »	0.02	0.7	0.05	0.05	0.02	0.02	0.01	0.02	0.05
Valore iniziale	63	131	0.7	0.6	20.0	0.5	12.0	3.4	1.2
Controllo	52	142	1.1	0.9	17.5	1.1	13.0	4.4	2.0
Uabaina $1 \cdot 10^{-5}$	40	138	0.5	1.1	15.2	1.3	14.7	2.3	1.4
differenza %	-16	—	-50	+22	-13	+18	+13	-50	-30
« P »	0.01	0.5	0.04	0.05	0.01	0.05	0.01	0.02	0.05
Valore iniziale	—	134	0.6	0.5	22.0	0.5	12.0	3.2	1.1
Controllo	—	140	1.0	1.0	20.0	1.4	14.0	5.0	2.2
Uabaina $1 \cdot 10^{-4}$	—	134	0.5	1.2	16.0	1.9	16.0	2.5	1.4
differenza %	—	—	-50	+20	-20	+35	+14	-50	-36
« P »	—	0.4	0.04	0.05	<0.01	0.03	<0.01	0.01	0.03

DISCUSSIONE

L'aumentata scissione di glicogeno che risulta dai miei esperimenti, s'accorda, pur nelle particolari modalità di esperimento — (omogenati) — con numerosi reperti della letteratura (LIEBIG, 27; HAENDEL e MUNILLA, 28; BOMSKOV e Coll., 29; SCHLESINGER, 30; TOSIZUMI, 31; FREUD, 32; CHERNES, 33). HAARMANN (34) poté dimostrare a questo proposito che il glicogeno aggiunto a pappa muscolare è scisso più rapidamente in presenza di strofantina (10^{-6} - 10^{-4}); vi sono tuttavia a questo riguardo alcune voci discordanti: trovarono infatti aumento di glicogeno nel cuore per somministrazione di digitalici: D'ALESSANDRIA (35) con osservazioni istologiche, LASCH e TRIGER (36), per effetto di somministrazione prolungata di strofantina, HAHN (37) come segno di accumulo. L'aumentata scissione di glicogeno e la diminuzione del glucoso-1-fosfato indicano un'accelerazione delle prime tappe della glicolisi ad opera della uabaina. Tale accelerazione è dimostrata anche, per dosi di uabaina di $1 \cdot 10^{-6}$, dall'aumentata formazione di acido lattico; un'accelerazione della glicolisi anaerobia è stata già da tempo dimostrata con ricerche in anaerobiosi (FREUD, 32; HAARMANN, 34).

Per concentrazioni di uabaina di $1 \cdot 10^{-6}$ si ha una diminuzione dell'acido piruvico, fatto che, data l'aumentata glicolisi, con aumentata formazione di acido lattico, deve essere interpretato come dovuto ad una maggiore ossidazione dell'acido piruvico; un'aumentata capacità ossidativa dei tessuti per azione dei digitalici a basse concentrazioni è provato d'altra parte da ricerche manometriche (LEVY, 38; WOLLENBERGER, 39; FINKELSTEIN e Coll., 40).

Per concentrazioni superiori di uabaina (10^{-5} - 10^{-4}) l'acido lattico compare in minor quantità e si ha un accumulo di acido piruvico, cosicché il rapporto acido lattico/ac. piruvico si abbassa. Questo è già stato posto da me in rilievo (1) ed attribuito ad un'influenza dei digitalici sul sistema lattico-deidrasico, molto probabilmente per un'azione sul coenzima. La diminuzione dell'acido lattico non è dovuta a sua minor formazione: infatti si ha aumentata scissione di glicogeno e di glucoso-1-fosfato; inoltre in condizioni anaerobiche, — come dimostrano le ricerche precedentemente citate, — o in condizioni di inibizione delle ossidazioni (mie precedenti esperienze (1) con NaCN), i digitalici causano una maggior formazione di acido lattico; d'altra parte la scomparsa del lattato aggiunto è accelerata dai digitalici, come ho già fatto notare (1) e come ho potuto riconfermare negli omogenati; si è quindi di fronte ad un reale spostamento dell'equilibrio $\text{ac. lattico} \rightleftharpoons \text{ac. piruvico}$.

L'accumulo dell'ac. piruvico è dovuto, oltre che allo spostamento dell'equilibrio suddetto, ad una inibizione della sua ossidazione, che ho potuto ad ogni modo constatare ricercando la scomparsa del piruvato aggiunto ad omogenati; una tale inibizione s'accorderebbe coi risultati di numerose ricerche manometriche, secondo le quali i digitalici per concentrazioni dell'ordine di 10^{-5} - 10^{-4} , diminuiscono il consumo di ossigeno di fette di tessuti (WOLLENBERGER, LEVY, etc.). A questo proposito le ricerche di MARDONES e Coll. (41), di FREIHERR (42), di FREUD (32) e di MEL'NIKOVA (43) dimostrano una maggiore scomparsa del lattato aggiunto al cuore isolato, per azione dei digitalici; NIEMEYER e Coll. (44), poi, dimostrano che la digitale accelera la scomparsa del lattato, ma non del piruvato aggiunto. Le mie osservazioni, che dimostrano un'inibizione del metabolismo dell'acido piruvico per dosi elevate di uabaina, presentano una notevole analogia con le esperienze di BAER (45) che provano un'inibizione della piruvicossidasi ad opera della protoanemonina, per blocco dei gruppi tiolici dell'apoenzima; la struttura della protoanemonina, un γ -lattone insaturo, aggruppamento pure presente nei digitalici, fa supporre un meccanismo simile anche in questi ultimi, meccanismo che, già da me supposto in precedenza, potrebbe avere una notevole importanza nella comprensione dei fenomeni tossici. In favore di questa concezione starebbero le osservazioni di REDONNET (46) secondo cui la tossicità dei digitalici è ridotta a metà per somministrazione di dimercaptopropanolo (noto donatore di gruppi SH), ed il fatto che numerose sostanze ossidanti e reagenti con i gruppi sulfidrilici (H_2O_2 , iodoacetamide, *o*-iodosobenzoato, etc.) possono produrre, come i digitalici, arresto sistolico del cuore di rana (MENDEZ e PERALTA, 47).

Le differenze notate a proposito dell'acido lattico e dell'acido piruvico a seconda della concentrazione della uabaina, possono interpretarsi supponendo che alla concentrazione di $1 \cdot 10^{-6}$ lo spostamento dell'equilibrio $\text{ac. lattico} \rightleftharpoons \text{ac. piruvico}$ non sia ancora tale da compensare la maggior produzione di ac. lattico dovuta all'accentuata glicolisi; infatti a tale concentrazione digitalici hanno già un effetto accelerante la scomparsa del lattato aggiunto (1); inoltre nelle emazie, di cui è noto il contenuto relativamente basso di glicogeno, si ha una minor comparsa di ac. lattico anche per tali concentrazioni di uabaina (1).

La maggior formazione di fosfati inorganici in presenza di uabaina indica una maggior scissione di fosfati organici, in parte dell'ATF e della FC, e probabilmente anche di altri composti, per ora non specificabili. Un aumento del fosforo inorganico è stato osservato pure da WEICKER (6) per azione della strofantina a concentrazioni elevate.

In miei dati riferentisi ad una maggior scissione dell'ATF ad opera della uabaina si accorderebbero con i risultati di GUERRA e Coll. (5), riferentisi ad una accentuazione della scissione dell'ATF per azione della miosina, e con quelli di WOLLENBERGER (7) e WEICKER (6) riguardanti la scissione dell'ATF e della FC nel preparato cuore-polmoni ad opera dei digitalici a concentrazioni elevate, ed appoggerebbero, almeno in parte, l'opinione di WOLLENBERGER di una migliore utilizzazione dei composti fosforati ricchi di energia per effetto dei digitalici.

L'inibizione dell'adenosintrifosfatasi, notata da DU BOIS e KIMURA (3) in contrasto con l'accentuata scissione osservata da GUERRA e Coll. e da me, potrebbe ricondursi ad un fenomeno aspecifico dovuto ad es. al blocco dei gruppi sulfidrilici ad opera dei digitalici, e non avere diretta relazione col problema del meccanismo della uabaina, del pari alle altre osservazioni di inibizione della scissione della FC (ABDON e NIELSEN, 4) e del glicerofosfato (COVELLO, 2).

La maggior scissione dell'ATF può rendere conto, almeno per una gran parte, della diminuzione del glicogeno e del glucoso-1-fosfato, e dell'aumento dell'esosodifosfato, il quale si forma dal glucoso-1-fosfato per fosforilizzazione mediante l'ATF; inoltre ci dà ragione della diminuzione della FC, la quale è in equilibrio con l'ATF e segue le variazioni di questo. Tale accentuata scissione dell'ATF, impregiudicata restando allo stato attuale delle conoscenze la questione della sua resintesi, può dare infine ragione della più rapida glicolisi sino all'acido lattico, che infatti si accumula sinchè, a concentrazioni maggiori di uabaina, interviene con maggior peso lo spostamento a destra dell'equilibrio $\text{ac. lattico} \rightleftharpoons \text{ac. piruvico}$. Dato che il metabolismo cardiaco è essenzialmente ossidativo, con utilizzazione dell'ac. lattico in prevalenza su quello del glucoso e del glicogeno, potrebbe questo essere uno dei vari meccanismi messi in gioco dal cuore insufficiente, sotto l'azione dei digitalici.

CONCLUSIONI

I digitalici, nelle condizioni sperimentali qui considerate (omogenati), dimostrano una notevole influenza sui processi che conducono dal glicogeno all'acido lattico e all'acido piruvico, attraverso la formazione di esteri fosforici ed in correlazione alle variazioni accoppiate sia della fosfocreatina che dell'adenosintrifosfato.

L'effetto dei digitalici che offre maggiori possibilità interpretative della loro azione utile è l'accentuata rimozione dell'acido lattico e la maggior scissione dell'adenosintrifosfato, che, in ultima analisi, fornisce diret-

tamente l'energia per la contrazione. La maggior parte delle altre variazioni biochimiche appare conseguenza di quest'ultima.

L'aumento della glicolisi con maggior consumo di glicogeno potrebbe essere uno dei meccanismi che il cuore mette in opera per mantenere la fornitura energetica quando, insufficiente, non possa più ricorrere al normale metabolismo ossidativo, soprattutto dell'acido lattico.

SUMMARY

Ouabaine, at concentrations of 1.10^{-6} - 1.10^{-5} - 1.10^{-4} , produces on the muscular homogenates of guinea-pigs the following metabolic modifications, proportionally to its concentration :

- 1) Diminution of glycogen and of glucose-1-phosphate; greater formation of hexosediphosphate;
- 2) Diminution of adenosintriphosphate and of phosphocreatine;
- 3) At the concentration of 1.10^{-6} it hastens the lactic acid's formation and reduces the pyruvic acid's production; at greater concentrations the lactic acid's formation is reduced and the pyruvic acid accumulates.

The fastened glycolysis and the greater breakdown of the energy-rich phosphates, as well as the shift of the equilibrium lactic acid \rightleftharpoons pyruvic acid are discussed in relation to the mode of action of the digitalis bodies.

BIBLIOGRAFIA

1. — G. SEGRE. *Arch. Int. de Pharm. et Thér.*, 1948, 75, 227.
2. — M. COVELLO. *Ann. di Chimica Applicata*, 1937, 27, 528.
3. — T. KIMURA e K. P. DUBOIS. *Science*, 1947, 106, 370.
4. — N. D. ABDON e N. NIELSEN. *Skand. Arch. f. Phys.*, 1938, 78, 10.
5. — F. GUERRA, P. EBERSTADT e A. VEERKAMP. *Arch. Inst. Cardiol. Méx.*, 1946, 16, 449 cit. da *Chem. Abstracts*, 1947, 41, 1754.
6. — B. WEICKER. *Arch. Exp. Path. u. Pharm.*, 1935, 178, 524.
7. — A. WOLLENBERGER. *Am. Jour. of Phys.*, 1947, 150, 733.
8. — W. BURNS e W. CRUICKSHANK. *Jour. of Phys.*, 1937, 91, 314.
9. — H. SCHUMANN. *Zeit. Ges. Exp. Med.*, 1939, 106, 59.
10. — I. CHANG. *Quart. Jour. Exp. Phys.*, 1938, 28, 3.
11. — L. KATZ. *Annual Rew. of Phys.*, 1940, 2, 191.
12. — H. GRAUER. *Helv. Med. Acta*, 1947, 14, 394.
13. — M. VISSCHER. *Am. Jour. of Phys.*, 1938, 123, 272.
14. — H. POLLAK. *Am. Jour. of Phys.*, 1934, 110, 97.
15. — A. J. CLARK, M. G. EGGLETON, R. GADDIE and C. P. STEWARD. The metabolism of the frog's heart. Edinburgh and London, 1938.

16. — A. WOLLENBERGER. *Fed. Proceedings*, 1947, 6, N° 1.
17. — G. EISMAYER e H. QUINCKE. *Arch. Exp. Path. u. Pharm.*, 1930, 150, 308.
18. — H. GREMELS. *Arch. Exp. Path. u. Pharm.*, 1933, 169, 689.
19. — A. M. WEDD e H. A. BLAIR. *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 1948, 68, 304.
20. — R. POTTER. *Jour. Cell. Comp. Phys.*, 1945, 26, 87.
21. — R. POTTER e C. A. ELVEHJEM. *Jour. Biol. Chem.*, 1936, 114, 416.
22. — C. GOOD, H. KRAMER e M. SOMOGY. *Jour. Biol. Chem.*, 1933, 100, 485.
23. — N. KAPLAN e D. M. GREENBERG. *Jour. Biol. Chem.*, 1944, 511, 156.
24. — J. WEITZER. *Bull. Soc. Biol.*, 1947, 29, 337.
25. — W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS e J. F. STAUFFER. *Manometric Techniques and related Methods*. Burgess Publ. Co. Minneapolis, 1948.
26. — R. A. FISHER. *Statistical Methods for Research Workers*. Oliver & Boyd, Edinburgh, 1946, 10th ed.
27. — H. LIEBIG. *Arch. Exp. Path. u. Pharm.*, 1940, 196, 137.
28. — M. HAENDEL e A. MUNILLA. *Bioch. Zeit.*, 1929, 212, 35.
29. — C. BOMSKOV, K. N. VON KAULLA e J. MAURATH. *Arch. Exp. Path. u. Pharm.*, 1941, 198, 213 e 223.
30. — SCHLESINGER, I. *Dissert. Münster*, 1935 (cit. da BOMSKOV, 29).
31. — TOSIZUMI YORIMITU. *Cit. da Chem. Abstracts*, 1944, 38, 6383.
32. — H. FREUD. *Arch. Exp. Path. u. Pharm.*, 1932, 167, 73.
33. — A. CHERNES e M. ANGARSKAYA. *Cit da Chem. Abstr.*, 1942, 36, 3262.
34. — W. HAARMANN. *Bioch. Zeit.*, 1932, 256, 326.
35. — M. D'ALESSANDRIA. *Fol. Med. Nap.*, 1932, 18, 1399.
36. — F. LASCH e K. TRIGER. *Zeit. Exp. Med.*, 1933, 88, 588.
37. — F. HAHN. *Arch. Exp. Path. u. Pharm.*, 1940, 194, 62.
38. — J. LEVY, O. LIBERT e A. SCHWOB. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, 28, 647, 771, 778.
39. — A. WOLLENBERGER. *Jour. of Pharm. & Exp. Ther.*, 1947, 91, 39.
40. — M. FINKELSTEIN e O. BODANSKI. *Jour. of Pharm. & Exp. Ther.*, 1948, 94, 274.
41. — J. MARDONES e N. ESPINOSA. *Cit. da Chem. Abstr.*, 1948, 42, 4276.
42. — W. FREIHERR. *Klin. Woch.*, 1941, 20, 737.
43. — V. MEL'NIKOVA e A. CHERNES. *Cit. da Chem. Abstr.*, 1946, 40, 2535.

- 44. — H. NIEMEYER e J. MARDONES. Cit. da *Chem. Abstr.*, 1948, 42, 4276.
- 45. — H. BAER. *Jour. Biol. Chem.*, 1948, 173, 211.
- 46. — T. A. REDONNET. Cit. da *Chem. Abstr.*, 1948, 42, 7871.
- 47. — R. MENDEZ e B. PERALTA. *Jour. of Pharm. & Exp. Ther.*, 1947, 90, 128.
- 48. — K. LOHMANN. *Bioch. Zeit.*, 1928, 194, 306.

INSTITUT J. F. HEYMANS DE PHARMACOLOGIE ET DE THÉRAPIE
DE L'UNIVERSITÉ DE GAND

INFLUENCES DU TÉTRA-ÉTHYL-AMMONIUM
SUR L'ACTION MYOTIQUE
DES DI-ISOPROPYLFLUOROPHOSPHONATE,
ACÉTYLCHOLINE, ÉSÉRINE ET PILOCARPINE
(With Summary)

PAR

C. HEYMANS ET A. HOORENS

(Travail reçu le 24-3-1949).

Nous nous sommes proposés, dans ce travail effectué chez le chien, de préciser les mécanismes d'action pharmacologique de différentes substances myotiques.

1. — *Action pupillaire du tétra-éthyl-ammonium.*

On sait que le tétra-éthyl-ammonium (TEA) paralyse les synapses végétatifs. Cette action synaptolytique n'est pas précédée, comme pour la nicotine, d'une phase de stimulation (1, 2).

L'injection intraveineuse (10-15 mg/kg) de TEA détermine une mydriase très prononcée; les pupilles ne réagissant plus à la lumière.

L'installation oculaire de TEA (1-10 %) ne modifie pas la diamètre pupillaire du chien.

L'injection sous-conjonctivale de TEA (0.2 cc. 10 %) ou l'injection intra-camérienne de TEA (0.1 cc. 0.25 %) provoque une légère mydriase; la pupille continuant toutefois à réagir à la lumière.

L'injection sous-conjonctivale de TEA à forte dose (0.45 cc. 10 %) provoque une mydriase maximale; donc avec participation active du dilateur. Le réflexe à lumière est aboli.

2. — *Influence du tétra-éthyl-ammonium sur le myosis provoqué par le di-isopropylfluorophosphonate (DFP) et l'acétylcholine.*

On sait que le di-isopropylfluorophosphonate (DFP) déclenche une série de réactions, dites cholinergiques, caractérisées par de la bradycardie, du bronchospasme, de l'hyperpéristaltisme, de la salivation et du mysosis.

Comme le DFP inactive les cholinestérases, de nombreux auteurs (3 à 9) attribuent les réactions, déclenchées par le DFP, à une mécanisme dit cholinergique, c'est à dire à l'action de l'acétylcholine.

L'installation oculaire répétée d'une solution aqueuse ou huileuse à 1-2 ‰ de DFP, provoque un myosis très persistant chez le chien (9).

Lorsqu'on administre, ensuite, 10-15 mg/kg de TEA en injection intraveineuse, le myosis provoqué par le DFP, disparaît aussitôt et fait place à de la mydriase. Cette mydriase disparaît environ 30 min. après l'injection de TEA.

L'injection sous-conjonctivale ou intra-camérienne d'acétylcholine chez l'œil en myosis partiel par le DFP, déclenche rapidement un myosis total.

L'injection sous-conjonctivale ou intra-camérienne d'acétylcholine chez l'œil normal, détermine également un myosis très net.

L'injection intraveineuse de 10-15 mg/kg de TEA n'a aucune influence sur le myosis acétylcholinique.

3. — *Tétra-éthyl-ammonium et myosis par l'ésérine.*

On sait que l'ésérine provoque du myosis.

En ce qui concerne le mécanisme du myosis ésérinique, rappelons que la section et la dégénérescence des fibres post-synaptiques de l'innervation parasympathique de la pupille, supprime ce myosis (10, 11). Les jonctions neuromusculaires de l'innervation parasympathique du sphincter irien doivent donc être intactes pour que le myosis ésérinique puisse se produire.

Rappelons que le curare et la nicotine, substances paralysantes des synapses et des jonctions neuromusculaires motrices, empêchent et suppriment le myosis ésérinique.

Différents auteurs ont émis l'hypothèse d'après laquelle l'ésérine, en inactivant les cholinestérases, déterminerait une accumulation d'acétylcholine au niveau de la périphérie de l'innervation parasympathique du sphincter irien. L'acétylcholine serait donc l'agent chimique intermédiaire provoquant le myosis ésérinique.

L'installation d'ésérine dans l'œil du chien détermine un myosis très prononcé. L'injection intraveineuse de 10-15 mg/kg de TEA entraîne une régression immédiate et importante du myosis ésérinique, et provoque de la mydriase, si l'on a instillé de faibles doses d'ésérine.

4. — *Tétra-éthyl-ammonium et myosis par la pilocarpine.*

On sait que l'installation de pilocarpine dans le cul de sac conjonctival détermine un myosis intense et prolongé.

Contrairement à l'ésérine et le DFP (9) ; la pilocarpine provoque encore le myosis après section et dégénérescence de l'innervation parasympathique de l'iris.

Le myosis par la pilocarpine, comme le myosis par l'acétylcholine, est même plus intense chez l'œil privé de son innervation parasympathique que chez l'œil normal. La pilocarpine et l'acétylcholine se différencient donc très nettement du DFP et de l'ésérine, en ce qui concerne le mécanisme de leur action myotique.

L'instillation de pilocarpine dans le cul de sac conjonctival de l'œil du chien normal provoque un myosis prononcé. L'injection intraveineuse de 10-15 mg/kg de TEA n'a pas d'influence sur ce myosis.

Ces observations expérimentales montrent donc que le myosis par la pilocarpine n'est pas supprimé par le tétra-éthyl-ammonium. La pilocarpine se comporte donc, à ce point de vue, comme l'acétylcholine, mais non comme le DFP et l'ésérine.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1) Le tétra-éthyl-ammonium, en injection intraveineuse, provoque de la mydriase maximale, avec abolition du réflexe à la lumière.

2) Le tétra-éthyl-ammonium, en injection sous-conjonctivale ou intra-camérienne, provoque une mydriase faible, avec maintien du réflexe à la lumière; de fortes doses provoquent cependant une dilatation pupillaire maximale.

3) Le myosis provoqué par le di-isopropylfluorophosphonate (DFP) est supprimé immédiatement par l'injection intraveineuse de tétra-éthyl-ammonium.

4) Le myosis provoqué par l'ésérine est diminué ou supprimé par le tétra-éthyl-ammonium.

5) Le myosis provoqué par l'acétylcholine n'est pas levé par le tétra-éthyl-ammonium.

6) Le myosis provoqué par la pilocarpine n'est pas levé par le tétra-éthyl-ammonium.

Ces faits expérimentaux soulèvent certaines questions en ce qui concerne le mécanisme d'action des myotiques étudiés.

SUMMARY

1) Tetra-ethyl-ammonium given by intravenous injections, induces a very marked mydriasis, with abolition of light reflexe.

2) Subconjunctival or intraocular injections of tetra-ethyl-ammonium produce a slight mydriasis, very high doses a maximal mydriasis.

3) Myosis induced by di-isopropylfluorophosphonate (DFP) or physostigmine is suppressed immediatly or reduced by intravenous injection of tetra-ethyl-ammonium.

4) Myosis induced by acetylcholine is not suppressed by tetra-ethyl-ammonium.

5) Myosis provoked by pilocarpine is not suppressed by tetra-ethyl-ammonium.

These facts are related to the mechanisms of action of the myotics used in these experiments.

BIBLIOGRAPHIE

1. — G. H. ACHESON et G. K. MOE. *Journ. of Pharmacol.*, 1945, 84, 189; 1946, 87, 220.
G. A. ACHESON et S. A. PEREIRA. *Ibid.*, 1946, 87, 273.
2. — R. E. BOELAERT. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1948, 75, 417.
3. — E. D. ADRIAN, W. FELDBERG et B. A. KILBY. Rep. Vz, III-70 Min. of Supply, Nov. 1942; *Nature*, 1946.
4. — A. MAZUR et L. BODANSKY. *J. Biol. Chem.*, 1946, 163, 261.
5. — G. B. KOELLE et A. GILMAN. *J. Pharmacol.*, 1946, 87, 421, 431.
6. — J. H. COMROE, J. TODD et G. B. KOELLE. *J. Pharmacol.*, 1946, 87, 28.
7. — W. MODELL, S. KROP, P. HITHCOCK et W. F. RICKER. *J. Pharmacol.*, 1946, 87, 400.
8. — W. F. RICKER et W. C. WESCOE. *Ibid.*, 1946, 88, 58.
9. — I. H. LEOPOLD et J. H. COMROE. *Arch. of Ophthamol.*, 1946, 36, 1, 17.
10. — P. SCHULT. *Arch. f. Anat. u. Physiol.*, 1898, p. 66.
11. — H. K. ANDERSON. *J. of Physiol.*, 1904, 30, 15; 1905, 33, 156, 414.

SOCIÉTÉ BELGE DE PHYSIOLOGIE

Réunion à Liège, le 21 mai 1949, sous la Présidence du
Prof. BACQ

TITRES DES COMMUNICATIONS ET DÉMONSTRATIONS

*dont le texte paraîtra dans le fasc. 2 du Tome 57
des Archives Internationales de Physiologie*

I. — COMMUNICATIONS.

- L. D'HOLLANDER, Louvain. — Activité électrique réflexe du sympathique, provoquée par des excitants de la sensibilité générale.
- P. NOLF, Bruxelles. — Plasma phosphaté et citrate de soude.
- J. P. DUSTIN, Bruxelles. — Contribution au microdosage électrophotométrique des protéines, basé sur la réaction du biuret.
- J. E. DE SMEDT, Bruxelles. — Les propriétés électrophysiologiques du muscle squelettique au cours de la dégénérescence wallérienne et dans le cas d'une atrophie non wallérienne (résection tendineuse).
- M. VAN EYCK, Bruxelles. — Potentiels microphoniques dérivés des ampoules des canaux semicirculaires chez le pigeon.
- F. BREMER et J. CHATONNET. — Acétylcholine et cortex cérébral.

II. — DÉMONSTRATIONS.

- L. LEFEBVRE, Liège. — Transplantation prolongée de reins au cou.
- LÉON DUMONT, Liège. — Influence vasomotrice de l'oestradiol.
- JEAN HUGUES, Liège. — Les variations du calibre vasculaire au cours des hémorragies.
- CH. GREGOIRE, GHISLAINE DUCHATEAU et M. FLORKIN, Liège. — La Coagulation de l'hémolymph de d'invertébré étudiée à l'aide du microscope électronique et du microscope à contraste de phases. Démonstration de micrographies.

INSTITUT J. F. HEYMANS DE PHARMACODYNAMIE ET DE THÉRAPIE
DE L'UNIVERSITÉ DE GAND
DIRECTEUR : PROF. DR C. HEYMANS

ACTION ANTIFIBRILLANTE CARDIAQUE DE NOUVEAUX COMPOSÉS (*)

(With Summary)

PAR

G. ROOBROECK

(Travail reçu le 10-3-1949).

Dans des travaux antérieurs, C. HEYMANS et G. R. DE VLEESCH-HOUWER (1), C. HEYMANS, J. J. ESTABLE et S. CASTILLO de BONNEVEAUX (2) ont observé que le diéthylamino-éthyl-ester de l'acide phénylcyclopentane carboxylique (Parpanit) et la phénothiazinyl-éthyl-diéthylamine (2987 R. P., Diparcol) protègent, dans une très large mesure, le cœur contre les actions toxiques de différents poisons nicotiniques, particulièrement la nicotine, l'acétylcholine et autres dérivés de la choline, le di-isopropylfluorophosphonate, l'hexa-éthyl-pyrophosphate et la pilocarpine.

Il nous a paru intéressant de rechercher si ces deux composés, le Parpanit et le Diparcol, possèdent une action antifibrillante sur le cœur.

On sait que l'injection intraveineuse d'adrénaline chez le chien inhalant du chloroforme ou du benzol, déclenche une fibrillation cardiaque ventriculaire. Cette fibrillation cardiaque constitue la syncope adrénalino-chloroformique ou -benzolique mortelle.

Dans nos expériences, exécutées chez le chien anesthésié à la chloralosane, nous avons observé que l'injection intraveineuse préalable de 10 mg/kg du diéthylaminoéthyl ester de l'acide phényl-cyclopentane

(*) Communication préliminaire à la Société Belge de Physiologie, le 21 mai, 1949 à Liège.

carboxylique (Parpanit) protégea tous les animaux (quatre chiens) contre la fibrillation cardiaque ventriculaire d'origine adrénalino-chloroformique. La dose de 5 mg/kg de Parpanit protégea trois animaux sur quatre. Cette action protectrice du cœur se maintient encore deux heures après l'injection de Parpanit.

En ce qui concerne la phénothiazinyl-éthyl-diéthylamine (Diparcol), nos expériences montrèrent que l'injection intraveineuse de 20 mg/kg protégea tous les animaux (quatre chiens) contre la fibrillation cardiaque adrénalino-chloroformique. Les doses de 15 mg/kg et 10 mg/kg de Diparcol protégèrent six animaux sur huit. Cette action protectrice fut encore observée une heure après l'injection de Diparcol.

Ces deux composés, le Parpanit et le Diparcol, possèdent donc une action protectrice très marquée contre la fibrillation cardiaque ventriculaire d'origine adrénalino-chloroformique.

L'action curative de ces composés vis à vis de la fibrillation cardiaque ventriculaire déjà installée, est toutefois nulle.

H. E. HOFF et L. H. NAHUM (3) ont montré que l'injection sous-cutanée de 2-5 mg/kg d'acétyl- β -méthylcholine (Améchol) protège le cœur du chien contre la fibrillation adrénalino-chloroformique. Nos expériences confirment ces observations. Tous les animaux (quatre chiens) furent, en effet, protégés par l'injection sous-cutanée de 2-5 mg/kg d'Améchol.

D'après LINDNER et KATZ (4) et MELVILLE (5), l'injection intraveineuse de chlorhydrate de papavérine (10 mg/kg) protège le cœur du chien contre la fibrillation ventriculaire. L'injection intracardiaque de papavérine (5 mg/kg), associée au massage du cœur, lève la fibrillation cardiaque.

Dans nos expériences, aucun chien (cinq) ne fut toutefois protégé, par l'injection de papavérine, contre la fibrillation cardiaque adrénalino-chloroformique. Chez trois animaux, où une fibrillation cardiaque ventriculaire fut déclenchée par excitation électrique du myocarde, l'injection intra-cardiaque de papavérine, associée au massage du cœur et la respiration artificielle, ne supprima pas la fibrillation ventriculaire.

T.C.R. SHEN (6) montra que les substances adrénolytiques (933 F, yohimbine), qui diminuent ou inversent l'action de l'adrénaline sur la pression artérielle, protègent contre la fibrillation cardiaque adrénalino-chloroformique. Nous avons observé que la dibenamine et la dihydroergotamine, autres substances adrénolytiques, possèdent la même propriété protectrice.

CONCLUSIONS

1) Le diéthylaminoéthyl ester de l'acide phényl-cyclopentane carboxylique (Parpanit) et la phénothiazinyl-éthyl-diéthylamine (2987 R. P., Diparcol) protègent le cœur contre la fibrillation ventriculaire d'origine adrénalino-chloroformique. Ces composés ne lèvent pas la fibrillation ventriculaire déjà installée.

2) L'acétyl- β -méthylcholine possède la même propriété protectrice.

3) La dibenamine et la dihydroergotamine, substances adrénolytiques, empêchent la fibrillation cardiaque adrénalino-chloroformique.

4) La papavérine possède ni action protectrice, ni action curative vis à vis de la fibrillation cardiaque ventriculaire.

SUMMARY

In dogs, administrations of diethylaminoethyl ester of phenyl-cyclopentane carboxylic acid (Parpanit), of diethylaminoethyl phenothiazine (2987 R. P., Diparcol) and of acetyl- β -methylcholine, in suitable doses, protect the heart against ventricular fibrillation, following injections of epinephrine during chloroform inhalations. The adreno-lytic compounds, dibenamine and dihydroergotamine, possess the same antifibrillatory action.

These compounds can not stop chloroform-epinephrine ventricular fibrillation previously induced.

Papaverine does not protect the heart against epinephrine-chloroform ventricular fibrillation and can not restore a normal coordinated heart beat if ventricular fibrillation has been previously induced.

BIBLIOGRAPHIE

1. — C. HEYMANS et G. R. DE VLEESCHHOUWER. *Arch. intern. Pharmacodyn.*, 1948, 75, 307.
2. — C. HEYMANS, J. J. ESTABLE et S. CASTILLO de BONNEVEAUX. *Science*, 1949, 109, 122. *Arch. intern. Pharmacodyn.*, 1949, 79, 185.
3. — L. H. NAHUM et A. E. HOFF. *Amer. J. Physiol.*, 1934, 109, 78; 110, 675; 1940, 129, 428; — *J. Pharmacol. and Exper. Therap.*, 1934, 50, 336; 52, 235.
4. — LINDNER et L. N. KATZ. *Amer. J. Physiol.*, 1941, 133, 1.
5. — K. I. MELVILLE. *Rev. Canad. Biol.*, 1948, 7, 236. *J. Pharmacol. and Exper. Therap.*, 1948, 94, 136.
6. — T. C. R. SHEN. *Arch. intern. Pharmacodyn.*, 1939, 61, 43.

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE
DE L'UNIVERSITÉ DE GAND

L'INFLUENCE DE LA TRAITE SUR LA DIURÈSE DE LA VACHE GRAVIDE (*)

PAR

G. PEETERS, R. COUSSENS, J. H. BOUCKAERT
ET W. OYAERT

(Travail reçu le 18-6-1949).

D'après les expériences de l'américain PETERSEN (1) et de nous-mêmes (2) il est prouvé que pendant la traite une hormone est déversée dans le circuit sanguin de la vache laitière. Cette hormone provoque l'éjection du lait et est généralement identifiée avec la pituitrine sécrétée par le lobe postérieur de l'hypophyse. Lors de la traite un réflexe excite l'hypophyse, qui déverse alors la pituitrine. Celle-ci provoque l'éjection du lait. Sachant que les hormones du lobe postérieur de l'hypophyse ont diverses fonctions, par exemple une action antidiurétique, nous avons voulu examiner si l'action antidiurétique existe lors de la traite. Les expériences furent faites sur une vache laitière, qui était gravis de deux à trois mois.

TECHNIQUE

On administre à une vache, 50 litres d'eau tiède par voie buccale. Environ une demie heure plus tard on introduit une sonde dans la vessie. La sonde est raccordée à un tube de caoutchouc, qui permet de recueillir facilement l'urine, qui s'écoule de façon continue de la vessie. L'urine est recueillie dans une mesurette de deux litres. Toutes les 5 minutes on mesure la quantité d'urine et ces quantités sont portées en graphique. Pendant les 30 premières minutes la quantité d'urine

(*) Communication préliminaire à la Société Belge de Physiologie, Liège, le 21 mai 1949.

excrétée est normale, pour augmenter progressivement pendant l'heure suivante. Vers la 100^{me} minute la diurèse atteint son maximum. A partir

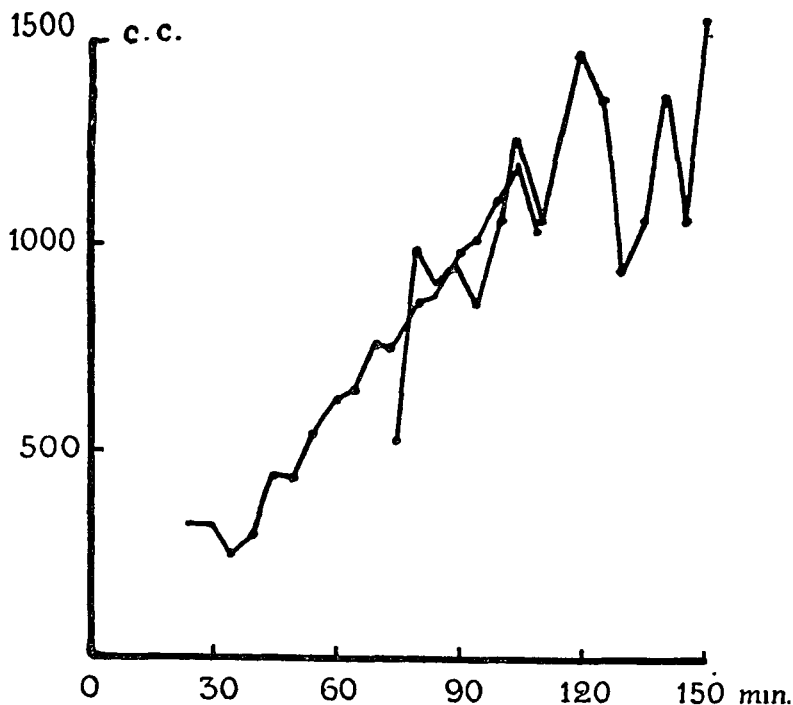


FIG. 1

Expériences de contrôle. En abscisses : temps. En ordonnées : volume d'urine.

de ce moment 1200 cc. d'urine très diluée sont sécrétés par 5 minutes (FIG. 1). Cette diurèse copieuse continue pendant plusieurs heures. L'animal restant tranquille pendant l'expérience, la traite fut normale.

RÉSULTATS

Nous avons pu constater une inhibition brusque de la diurèse chaque fois que l'animal a été traité endéans les 60 minutes après le début de l'expérience. De ce fait la courbe normale de diurèse est déplacée vers la droite (FIG. 2). Dans certains cas, l'inhibition de la diurèse était très prononcée, quoique la courbe présentait un aspect très irrégulier (FIG. 3). Sans doute, il faut tenir compte du fait que des contractions de la vessie peuvent se produire sous des influences nerveuses ou hormonales. Ces contractions peuvent fausser l'aspect normal de la courbe de diurèse. La quantité totale d'urine excrétée entre la 70^{me} et la 110^{me} minute après le début de l'expérience démontre l'effet d'inhibition produit sur

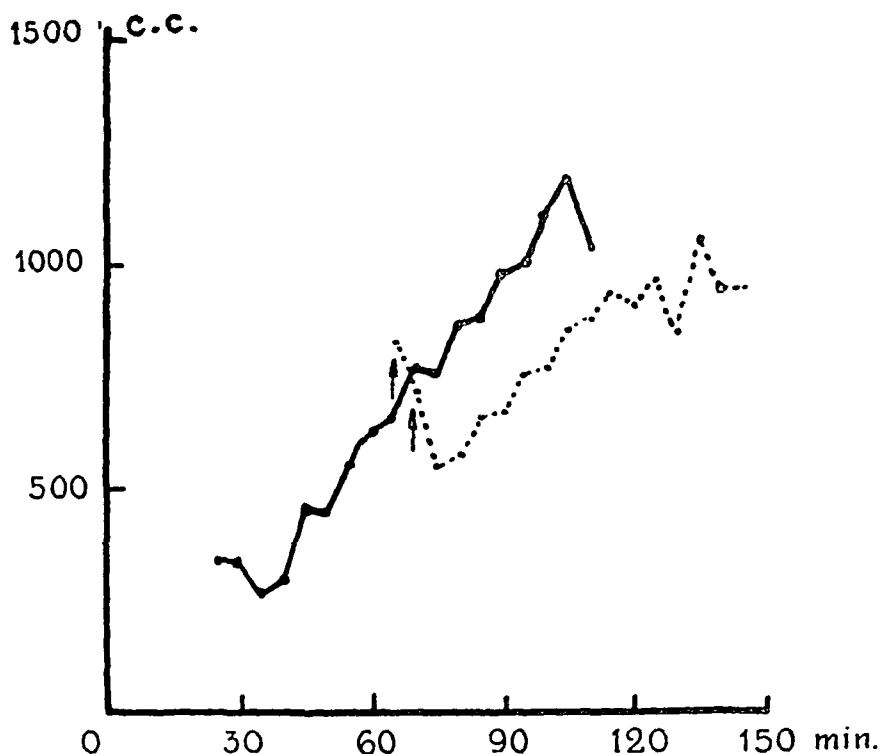


FIG. 2

Influence de la traite ↑↑ sur la courbe de la diurèse.

— : diurèse normale.

----- : diurèse pendant la traite.

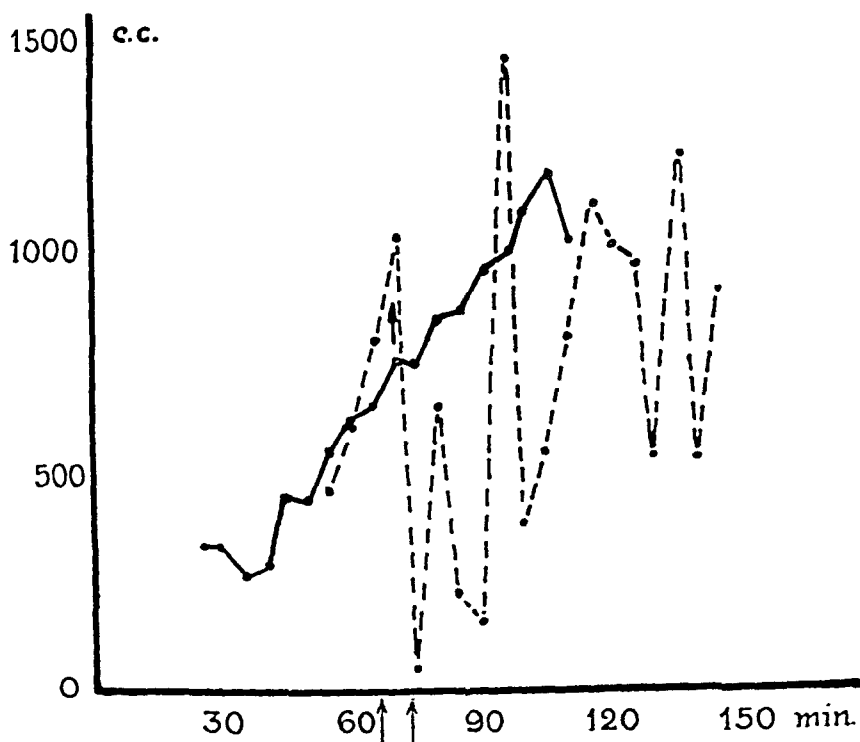


FIG. 3

Influence de la traite ↑↑ sur la courbe de la diurèse.

— : diurèse normale.

----- : diurèse pendant la traite.

la diurèse. Nous avons fait deux expériences de contrôle et recueilli l'urine entre la 70^{me} minute et la 110^{me} minute avec les résultats suivants :

- 1) Expérience : 7610 cc d'urine.
- 2) Expérience : 7740 cc d'urine.

La moyenne s'élève donc à 7675 cc. Quand nous faisons la traite vers la 65^{me} minute nous obtenons, dans 3 expériences, les valeurs respectives de 6350 cc, 5760 cc et 4380 cc., soit une moyenne de 5496 cc. Le pourcentage d'inhibition s'élève donc à 29 %. Au cours de deux autres expériences où la traite fut effectuée vers la 120^{me} minute, nous avons constaté une inhibition nette, mais moins marquée.

Les effets inhibiteurs de la traite sur la diurèse sont probablement d'origine hormonale et provoqués par la mise en circulation d'hormone anti-diurétique, sous l'influence de la traite. Le caractère hormonal de cette inhibition est démontré par deux faits :

- 1) L'effet inhibiteur se prolonge longtemps après la traite.
- 2) La courbe de diurèse après la traite, reste parfaitement parallèle à la courbe contrôle, mais est déplacée d'environ 25 minutes.

D'après VERNEY(3), la fonction du lobe postérieur de l'hypophyse est déprimée par l'hypotonie du sang. Dans nos expériences le lobe postérieur est donc soumis à deux effets antagonistes : l'hypotonie du sang qui diminue et le réflexe de la traite qui stimule la sécrétion de l'hypophyse.

LITTÉRATURE

1. — PETERSEN, W. E., et LUDWICK T. M. *Fed. Proc.*, 1942, 1, 66.
2. — G. PEETERS, L. MASSART et R. COUSSENS. *Arch. int. Pharmacodyn. & Thérap.*, 1947, 75, 85-89.
3. — O'CONNOR et VERNEY. *Q. J. Exp. Physiol.*, 1942, 31, 393.

INSTITUT J. F. HEYMANS DE PHARMACODYNAMIE ET DE THÉRAPIE
DE L'UNIVERSITÉ DE GAND

DIRECTEUR : PROF. DR C. HEYMANS

ACTIONS PHARMACOLOGIQUES SUR LES BRONCHES DU COBAYE (*)

(*With Summary*)

PAR

A. DE SCHAEPPDRYVER

(*Travail reçu, le 10-3-1949*).

Dans un travail antérieur (1), nous avons montré que différentes substances préviennent ou suppriment le bronchospasme, déterminé par certaines substances pharmacologiques ou par le choc anaphylactique, chez les poumons isolés et perfusés du cobaye.

Nous avons poursuivi ces expériences en examinant l'action d'une série de substances pharmacologiques sur le tonus des bronches de cobaye *in vivo*, en utilisant la technique de KONZETT et ROESSLER (2), EMMELIN, KAHLSON et WICKSELL (3) et HALPERN (4).

Voici les résultats des expériences qui ont porté sur 70 cobayes, dont 51 normaux et 19 anaphylactisés.

L'ester diéthylaminoéthylque de l'acide phényl-cyclopentane carboxylique (Parpanit) prévient et lève le bronchospasme déterminé par l'acétylcholine et l'histamine.

Le chlorhydrate de diéthylaminoéthyl-thiodiphénylamine (2987 R. P., Diparcol) prévient et lève le bronchospasme provoqué par l'acétylcholine, et prévient le bronchospasme déterminé par l'histamine, la nicotine et le choc anaphylactique.

La dibenzylméthylamine (566 L.) ne diminue que légèrement le bronchospasme acétylcholinique et histaminique.

La tubocurarine (20 doses curarisantes) et l'Intocostrine (20 doses curarisantes), ne provoquent de bronchospasme, ni *in vivo*, ni chez les

(*) Communication préliminaire à la Société belge de Physiologie, Liège, 21 mai, 1949.

poumons perfusés; alors que l'histamine provoque toujours, sur ces mêmes poumons, un bronchospasme très marqué.

Le chlorhydrate de tétra-éthyl-ammonium prévient le bronchospasme déterminé par la nicotine, mais non le bronchospasme provoqué par l'acétylcholine et l'histamine.

SUMMARY

Experiments, performed on the bronchial tone of guinea pigs, showed:

1) Diethylaminoethyl ester of phenyl-cyclopentane carboxylic acid (Parpanit) prevents and suppresses bronchospasm, induced by acetylcholine and histamine.

2) Diethylaminoethyl-thiodiphenylamine (2987 R. P., Diparcol) prevents and suppresses bronchospasm induced by acetylcholine, and prevents bronchospasm provoked by histamine, nicotine and anaphylactic shock.

3) Dibenzylmethylamine (566 L.) decreases slightly bronchospasm induced by acetylcholine and histamine.

4) Tubocurarine and Intocostrine (up to 20 curarizing doses) do not induce bronchospasm either in vivo or in perfused isolated lungs, although histamine provokes active bronchospasm in the same lungs.

5) Tetraethylammonium prevents bronchospasm induced by nicotine, but not by acetylcholine and histamine.

BIBLIOGRAPHIE

1. — A. DE SCHAEPPDRYVER. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1948, 77, 46.
2. — H. KONZETT et R. ROESSLER. *Arch. exp. Pathol. u. Pharmacol.*, 1940, 195, 71.
3. — N. EMMELIN, G. S. KAHLSON et F. WICKSELL. *Act. Physiol. Scand.*, 1941, 2, 110, 123.
4. — B. N. HALPERN. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1942, 68, 339.

INSTITUT LÉON FREDERICQ. PHYSIOLOGIE. LIÈGE

**POUVOIR ANTICHOLINESTÉRASIQUE DE LA CAFÉINE,
DE LA THÉOPHYLLINE ET DE LA THÉOBROMINE (1)**

PAR

Y. BOUNAMEAUX ET M. GOFFART

(Travail reçu, le 24-3-39).

Le laboratoire de H. FREDERICQ a consacré une série de travaux à l'étude des méthylxanthines (1, 2, 3, 4). GOUTIER (5, 6, 7, 8) a récemment repris le problème en fonction de la propriété qu'ont ces substances de sensibiliser les tissus aux ions potassium. Or il apparaît que dans la discussion du travail de ces auteurs, le pouvoir anticholinestérasique de la caféine est le plus souvent apprécié en se référant à un article de KAHANE et LEVY (9). La littérature fournit encore d'autres données, mais on remarque que les conditions d'expérience, les doses de substrat et d'inhibiteur sont fort différentes d'une publication à l'autre; les auteurs arrivent à des conclusions opposées. Sur le pouvoir anticholinestérasique de la théobromine et de la théophylline, les renseignements sont plus rares. C'est pour toutes ces raisons que nous nous sommes proposés d'étudier de façon plus approfondie l'action anticholinestérasique de ces trois méthylxanthines.

Par une méthode titrimétrique KAHANE et LEVY (9) avaient constaté que 250 mgrs. % de caféine inhibaient presque totalement l'hydrolyse de 900 mgrs. % d'acétylcholine en une heure, par 1.cc. de sérum de cheval, (« pseudo » cholinestérase). BERNHEIM et BERNHEIM (10) ont montré que 20 mgrs. % de caféine agissent sur un mélange de 7 mgrs. % d'acétylcholine et d'estérase du cerveau de rat, (cholinestérase « vraie »), en prolongeant de 100 % le temps d'hydrolyse nécessaire pour rendre le mélange inactif sur l'iléon de cobaye. Sans donner beaucoup de détails techniques, NACHMANSOHN et SCHNEEMAN (11) arrivent à la conclusion

(1) La note préliminaire dans les C.R. Soc. Biol. 1948, 142, 1193 contient plusieurs erreurs de chiffres.

que la caféine à 5,3 mgrs. % inhibe de 50 % l'estérase vraie de l'organe électrique de la torpille et qu'une dose quadruple inhibe de 30 % l'estérase du cerveau de bœuf, tandis que des concentrations même plus élevées s'avèrent sans action sur la pseudocholinestérase du sérum de cheval et du pancréas de cobaye. Utilisant une méthode biologique consistant à mesurer le temps de demi-décontraction par addition de cholinestérase à un bain où un rectus de grenouille est contracté par 30 à 200 μ grs. d'acétylcholine, DENYS et LEVY (12) sont aussi d'avis que la caféine agit électivement sur la cholinestérase « vraie » des globules rouges, à la dose de 20 mgrs. % en bloquant complètement l'hydrolyse de l'acétylcholine. 40 mgrs. % de caféine ne font que retarder faiblement l'hydrolyse de l'acétylcholine par la « pseudo » cholinestérase du sérum de cheval. Ces deux derniers travaux venaient confirmer ceux de ZELLER et BIESSIEGER (13) qui pour 96 mgrs. % d'ac.ch. et 116 mgrs. % de caféine n'observent qu'une inhibition de 4 % sur l'estérase du sérum humain. Pour H. CASIER (14), la caféine de 100 mgrs. % à 1000 mgrs. % serait sans action sur les cholinestérases des globules rouges et du sérum. Enfin, SCHÜTZ (15) est d'avis qu'aux doses thérapeutiques, la caféine est sans action sur l'activité cholinestérasique du sérum humain.

En résumé, ces travaux sont contradictoires, et les renseignements sur le pouvoir anticholinestérasique des diméthylxanthines, théobromine et théophylline, manquent.

Nous mêmes, sommes arrivés à la conclusion que la caféine a une action sur les deux types de cholinestérase, que cette action inhibitrice existe aux doses employées en pharmacologie, et que les trois méthylxanthines étudiées agissent suivant des modalités différentes. Il ressort de la discussion que cette propriété anticholinestérasique ne joue probablement aucun rôle important.

TECHNIQUE

Nous avons employé la méthode de WARBURG, utilisant le tampon bicarbonaté « Ringer. 30 » recommandé par AMMON (6), ramené au pH 7,2 par barbotage de CO² en présence de rouge de phénol. Les expériences ont été faites à 38°.

Comme source d'estérase, nous avons employé le sérum de cheval (« pseudo »-cholinestérase) et un broyat de cerveau de rat (cholinestérase « vraie »). Le cerveau de rat est broyé avec un peu d'eau distillée, on centrifuge, rejette le liquide surnageant et redilue le culot dans un égal volume d'eau. Sauf indication contraire, nous avons utilisé 0,5 cc. de

suspension de cerveau ou de sérum pour un volume final de 4,5 cc. Les méthylxanthines étant peu solubles, pour arriver à une concentration élevée, nous avons dû les dissoudre directement dans le tampon.

RÉSULTATS

I. — CAFÉINE

a) *Pseudocholinestérase.*

Notre premier souci a été de chercher à reproduire les expériences de KAHANE et LEVY (9) en suivant exactement leur technique, avec les mêmes doses d'acétylcholine et de caféine. Nous avons pu obtenir au bout d'une heure, des inhibitions de 19, 16,7 et 4,5 %, mais celles-ci n'excèdent pas la marge d'erreur de la méthode, qui est de 20 % (17). Les résultats sont les mêmes, qu'on emploie le sérum de chien ou le sérum de cheval, et jamais nous n'avons pu obtenir l'inhibition de 100 % que signalent KAHANE et LEVY. Nous avons ensuite poursuivi notre recherche au WARBURG.

La caféine ne « bloque » pas la cholinestérase, elle ne fait que ralentir son action. La réaction atteint le même équilibre, mais après un temps plus prolongé. Pour observer une inhibition, il faut donc faire les lectures au manomètre avant que l'équilibre soit atteint. D'après MENDEL et RUDNEY (18), l'optimum d'activité de la « pseudo » cholinestérase s'observe pour des doses assez élevées d'acétylcholine. Maintenant fixe la quantité de sérum de cheval (0,5 cc. pour 4,5 cc. de volume final), nous avons fait varier dans 15 expériences, le taux d'acétylcholine de 50 à 300 mgrs. % ($3 \cdot 10^{-3}$ à $1,8 \cdot 10^{-2}$ M.) et la dose de caféine de 100 à 1000 mgrs. % ($5 \cdot 10^{-2}$ à $6 \cdot 10^{-3}$ M.). Le calcul des inhibitions après 5 minutes, avant l'arrivée à l'équilibre, montre que cette inhibition est fonction du rapport des concentrations moléculaires entre l'acétylcholine et la caféine. Si on fait varier le rapport :

$$\frac{\text{Concentration M. d'acétylcholine}}{\text{Concentration M. de caféine}} \text{ de } 0,06 \text{ à } 3,$$

on constate que le pourcentage d'inhibition passe de 61 à 2. Si on calcule ce rapport des concentrations moléculaires dans les expériences de KAHANE et LEVY (9), on s'aperçoit qu'il est de 4,2, ce qui fait prévoir au bout de 5 minutes une inhibition de moins de 2 %. En tenant compte du fait que la mesure de ces auteurs est faite après 60 minutes, leur résultat nous paraît inexplicable.

Nous avons aussi fait varier la quantité de sérum de cheval de 0,2 à 0,5 cc. en maintenant constante la quantité d'acétylcholine : 133 mgrs. % ou $8,1 \cdot 10^{-3}$ M. et la dose de caféine : 444 mgrs. % ou $2,2 \cdot 10^{-2}$ M. On remarquera dans le tableau I que l'inhibition en % après 10 minutes, est du même ordre de grandeur, quelle que soit la quantité d'estérase en présence, pourvu que le rapport $\frac{\text{substrat}}{\text{inhibiteur}}$ soit constant.

TABLEAU I

Inhibition de l'hydrolyse de l'acétylcholine 133 mgrs. % ($8,1 \cdot 10^{-3}$ M.) en présence de Caféine 444 mgrs. % ($2,2 \cdot 10^{-2}$ M.) en faisant varier la quantité de « pseudo » cholinestérase.

Quantité de sérum de cheval en cc.	Dégagement du témoin en 10 minutes, exprimé en mm ³ CO ₂	Dégagement en 10 minutes, en présence de l'inhibiteur (mm ³ CO ₂)	Inhibition en %
0,2	214	142,3	33
0,3	281	204,5	27
0,4	320,4	201	38
0,5	287,6	200	30

Ces deux ordres de faits nous amènent à penser que l'inhibition du pouvoir cholinestérasique du sérum est due à une compétition entre l'acétylcholine et la caféine pour s'unir à l'enzyme, et que l'inhibition dépend du rapport des compétiteurs et non de la quantité de cholinestérase en présence. Cette liaison de la caféine au ferment doit être extrêmement lâche, car si la caféine est ajoutée à la cholinestérase deux heures avant la réaction, la courbe d'inhibition se superpose à celle qu'on obtient en faisant intervenir la caféine au moment où débute la réaction.

b) Cholinestérase « vraie ».

Comme nous l'avons fait remarquer pour la « pseudo »-cholinestérase, l'action de la caféine est essentiellement une action retardatrice de l'hydrolyse de l'acétylcholine.

Le dégagement de CO₂ dans les manomètres contenant de l'inhibiteur se stabilise au même niveau que le témoin, mais avec un retard d'autant plus grand que la concentration de caféine est plus élevée, (Fig. 1, Courbes 3, 4, 5, 6). Il s'ensuit que suivant le moment choisi pour faire la lecture, on observera une inhibition ou non (TABLEAU II).

TABLEAU II

Pourcentage d'inhibition de l'hydrolyse de l'acétylcholine 25 mgrs. % par la cholinestérase vraie, en présence de diverses concentrations de Caféine, en fonction de temps.

Temps	Concentration de caféine en mgrs %			
	1000	500	100	25
4	63	57	55	26
10	47	38	24	0
18	20	11	0	0
26	10	0	0	0
34	0	0	0	0

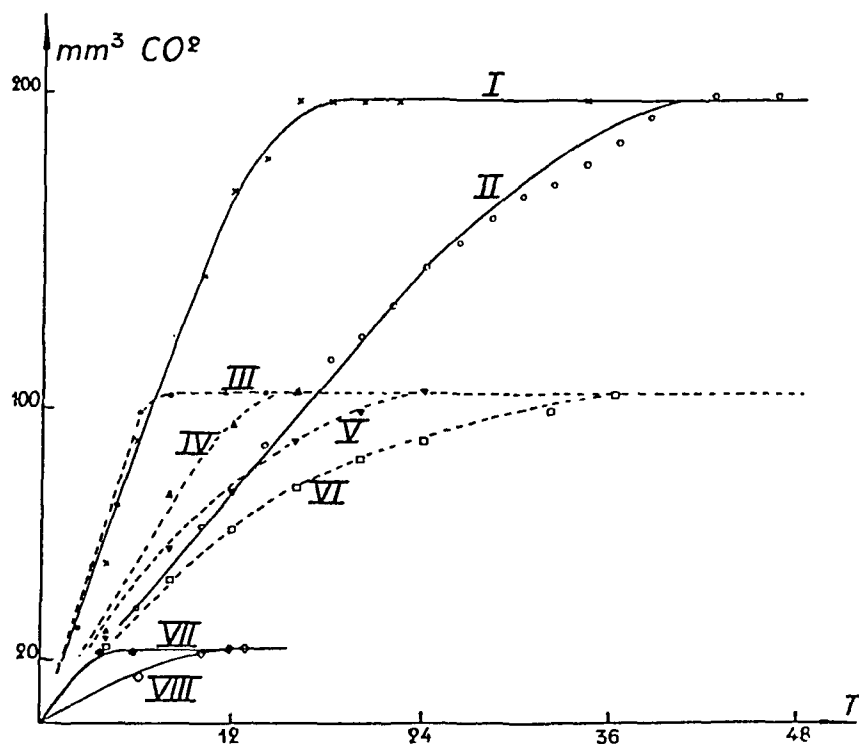


FIG. I

Courbes d'hydrolyse de l'acétylcholine par la cholinestérase « vraie » du cerveau. Influence de la caféine.

- I. Croix : Ac.Ch. 50 mgrs. % (Témoin).
- II. Cercles : Ac.Ch. 50 mgrs. % + Caféine 250 mgrs. %
- III. Points : Ac.Ch. 25 mgrs. % (Témoin).
- IV. Triangles pointe en haut : Ac.Ch. 25 mgrs. % + Caféine 100 mgrs. %
- V. Triangles pointe en bas : Ac.Ch. 25 mgrs. % + Caféine 500 mgrs. %
- VI. Carrés : Ac.Ch. 25 mgrs. % + Caféine 1000 mgrs. %
- VII. Losanges noirs : Ac.Ch. 5 mgrs. % (Témoin).
- VIII. Losanges blancs : Ac.Ch. 5 mgrs. % + Caféine 25 mgrs. %

Ordonnées : Activité en mm^3 de CO_2 .

Abcisses : Temps en minutes.

Si on étudie l'inhibition pour une large série de concentrations de substrat et d'inhibiteur, (FIG. 1), pour pouvoir comparer les résultats, il faut, soit se borner à faire une ou deux lectures aux temps très courts en dessous de cinq minutes, soit attendre l'équilibre, et définir l'inhibition par le retard mis à arriver à l'état d'équilibre. En calculant le nombre de molécules de CO_2 dégagées, correspondant au nombre de molécules d'acétylcholine hydrolysées, nous avons pu vérifier que la réaction atteint son équilibre quand il y a trois molécules de choline en présence d'une molécule d'acétylcholine.

Nous avons choisi de caractériser le pouvoir anticholinestérasique par le « facteur de retardement », c.-à-d. le facteur par lequel il faut multiplier

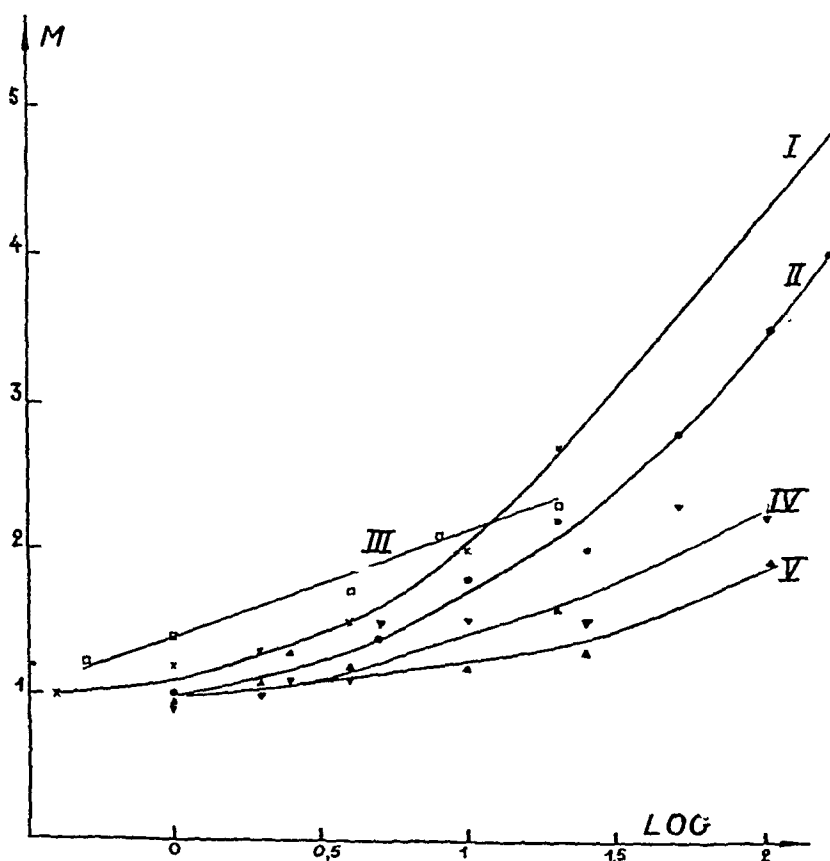


FIG. 2

Variation du « Facteur de retardement » M , en fonction du logarithme du rapport
Concentration de l'inhibiteur

Concentration de l'acétylcholine. calculé en concentration pondérale.

- I. Croix : Caféine sur la cholinestérase du cerveau.
- II. Points : Caféine sur la cholinestérase du sérum.
- III. Carrés : Théobromine sur la cholinestérase du cerveau.
- IV. Triangles pointe en bas : Théophylline sur la cholinestérase du cerveau.
- V. Triangles pointe en haut : Théophylline sur la cholinestérase du sérum.

TABLEAU III

Facteur de retardement (voir texte) provoqué par la caféine, la théobromine, et la théophylline, à diverses concentrations, sur l'action de la « vraie » et de la « pseudo » cholinestérase, à diverses concentrations d'acétylcholine.

Sol. de d'estérase. 0,5 cc pour volume total 4,5 cc.	Concentration d'inhibiteur en mgrs. %	Concentration d'acétylcholine en mgrs. %				
		100	50	25	10	5
Cerveau de rat	Caféine					
	1000	2,3	2,9	4	4	5
	500	1,9	2,6	2,8	3,5	4,1
	250	1,4	2,4	2,3	3	3,3
	100		1,4	1,6	2,1	2,4
	50		1,2		2	1,7
	25		1,1	1,2	1,3	1,7
	20					1,4
	10			1.	1,1	1,1
	5				1	1
Sérum de cheval	Caféine					
	1000			3,2	3,6	4
	500			2,4	2,6	3,5
	250			2,2	2	3
	100			1,4	1,6	2
	50			1,2	1,4	1,7
	25			1	1	1,5
	10					1,2
	5					1,1

TABLEAU III (*Suite*)

Source d'estérase. 0,5 cc. pour volume final 4,5 cc.	Concentration d'inhibiteur en mgrs. %.	Concentration d'acétylcholine en mgrs. %				
		100	50	25	10	5
Cerveau de rat	Salicylate Na et Théobromine					
	100			1,7	2	2,2
	50			1,4	1,8	2,2
	25			1,1	1,8	2
	10				1,4	2
	5				1,2	1,7
	2,5				1,1	1,2
Sérum de cheval	Salicylate Na et Théobromine					
	100			1	1	1
Cerveau de rat	Théophylline					
	500			1,8	2,5	2
	250			1,6	1,5	1,8
	100			1,1	1,2	1,8
	50			1	1,2	1,4
	25			1	1,1	1
	10				1	1
	5					1
Sérum de cheval	Théophylline					
	500			2,4	1,4	2,1
	250			1,3	1	1,2
	100			1,2	1	1,2
	50			1,1	1	1
	25			1,1	1	1
	10			1	1	1

le temps mis par le témoin pour arriver à l'équilibre, pour retrouver le temps mis pour atteindre le même équilibre en présence de l'inhibiteur. Le tableau III montre l'influence de diverses concentrations de caféine pour diverses doses d'acétylcholine, exprimée par le facteur de retardement.

On remarquera qu'ici, comme pour la « pseudo » cholinestérase, l'inhibition varie en fonction du rapport des concentrations d'acétylcholine et de caféine, et que pour une dose de caféine de 1/10.000 couramment employée en pharmacologie, lors de l'étude de l'activité de la caféine sur des organes ou tissus isolés, le retard apporté à l'arrivée à l'équilibre est de 10 % pour l'hydrolyse de 5 mgrs. % d'acétylcholine, la plus petite dose qui permette une lecture sûre avec notre appareillage de WARBURG.

La fig. 2 illustre l'influence du rapport $\frac{\text{caféine}}{\text{acétylcholine}}$ sur le facteur de retardement. On constate que l'effet de la caféine sur la cholinestérase « vraie » est plus marqué que sur la « pseudo » cholinestérase, bien qu'avec notre technique nous soyons loin de constater l'inefficacité totale ou presque totale de la 1.3.7 triméthylxanthine sur la « pseudo » cholinestérase (11, 12, 13).

II. — THÉOBROMINE

La faible solubilité de la théobromine nous a incités à employer le salicylate double de Na et de théobromine, qui contient 45 % environ de son poids en théobromine (1). Nous n'avons néanmoins pu utiliser de concentration supérieure à 100 mgrs. %. Le salicylate de soude n'a par lui même aucune action anticholinestérasique appréciable sur l'enzyme du cerveau de rat. Le témoin (10 mgrs. % d'acétylcholine) dégage 43,5 mm³ de CO₂ en 5 minutes; le manomètre contenant 10 mgrs. % d'ac.ch. + 50 mgrs. % de salicylate de Na dégage 40,5 mm³. Ce qui confirme l'observation de BERNHEIM et BERNHEIM (10).

a) « Pseudo » cholinestérase.

La figure 3 montre que le salicylate de Na et théobromine, 100 mgrs. % est dépourvu de toute activité anticholinestérasique et que la courbe de dégagement de CO₂ se superpose à celle du témoin. On voit aussi que

(1) Le salicylate double de Na et Théobromine, « Diuromine » KNOLL, Londres, nous a été aimablement fourni par le Pr. C. Heymans.

l'activité inhibitrice des trois méthylxanthines étudiées sur le sérum de cheval s'établit dans l'ordre :

Théophylline > Caféine > Théobromine = O.

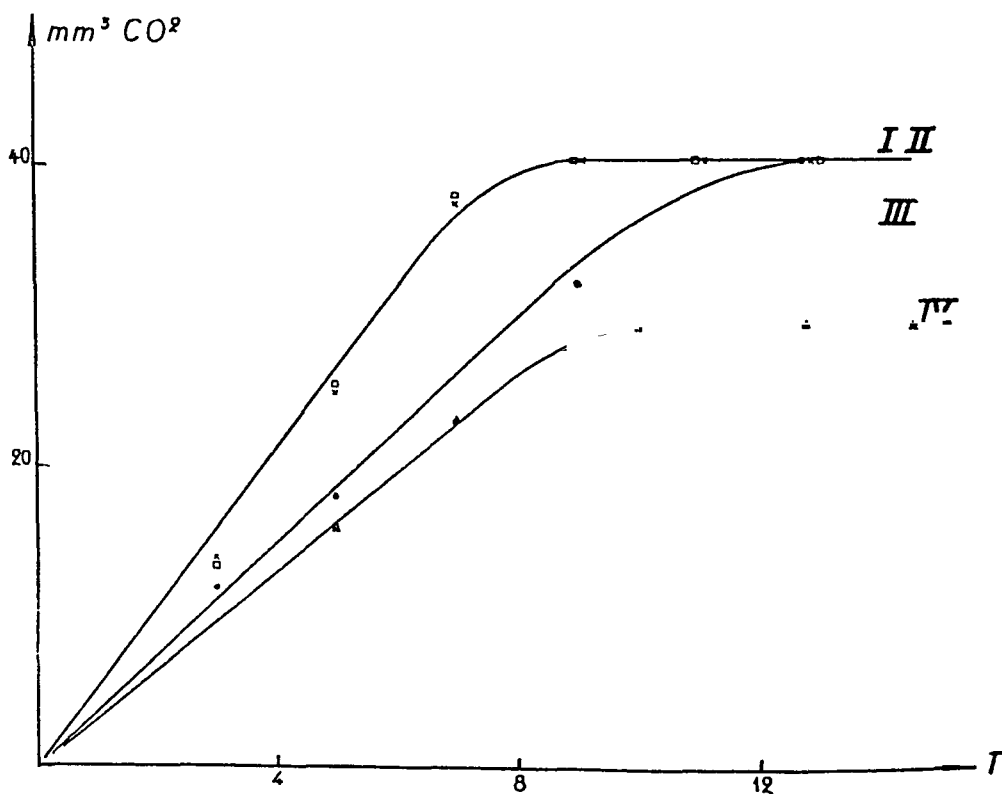


FIG. 3

Comparaison de l'activité anticholinestérasique des diverses méthylxanthines sur la cholinestérase du sérum de cheval.

- I. Carrés : Ac.Ch. 10 mgrs. % (Témoin).
- II. Croix : Ac.Ch. 10 mgrs. % + Salicylate Na et Théobromine 100 mgrs %
- III. Points : Ac.Ch. 10 mgrs. % + Caféine 100 mgrs. %
- IV. Triangles : Ac.Ch. 10 mgrs. % + Théophylline 100 mgrs. %

Abcisses : Temps en minutes.

b) Cholinestérase « vraie ».

Le salicylate de Na et de théobromine a une action inhibitrice sur la cholinestérase « vraie » du même type que la caféine. Le facteur de retardement varie en fonction du rapport des concentrations $\frac{\text{théobromine}}{\text{acétylcholine}}$ (Tabl. III et Fig. 2).

Si on tient compte, dans la figure 4, du fait que 55 % du poids du sel est constitué de salicylate de soude inactif, on peut dire que l'ordre des activités décroissantes des trois produits est :

Théophylline > Théobromine > Caféine.

Toutefois à la dose de 10 mgrs. % la théobromine et la caféine sont encore actives, alors que la théophylline ne l'est plus, et l'ordre d'activité est modifié.

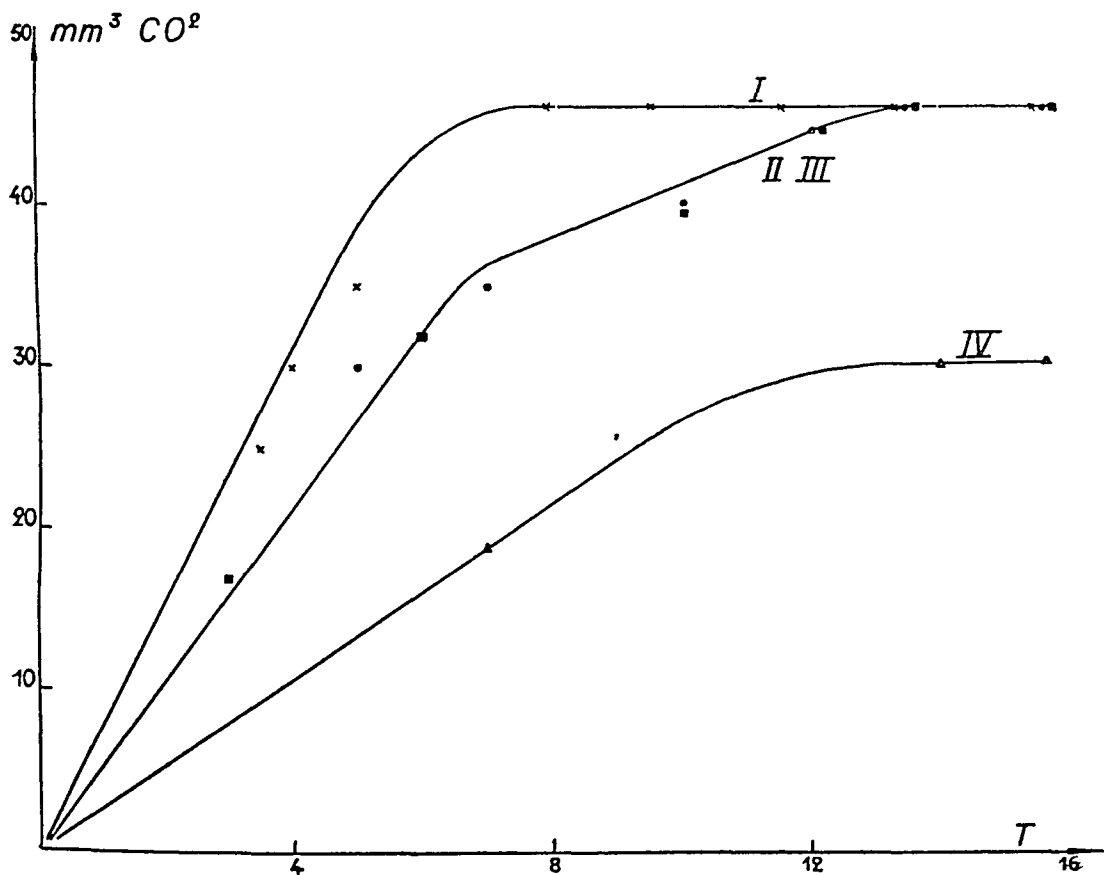


FIG. 4

Comparaison de l'activité anticholinestérasique des diverses méthylxanthines sur la cholinestérase du cerveau de rat.

- I. Croix : Ac.Ch. 10 mgrs. % (Témoin).
- II. Points : Ac.Ch. 10 mgrs. % + Caféine 100 mgrs. %
- III. Carrés : Ac.Ch. 10 mgrs. % + Salicylate Na et Théobromine 100 mgrs. %
- IV. Triangles : Ac.Ch. 10 mgrs. % + Théophylline 100 mgrs. %

Abcisses : Temps en minutes.

III. — THÉOPHYLLINE

La théophylline, comme la caféine, agit sur les deux cholinestérases, mais elle diffère de la caféine et de la théobromine en ce que, outre sa propriété retardatrice, elle conditionne un nouvel état d'équilibre. On peut donc dire qu'elle « bloque » une partie des cholinestérases, et que l'intensité de ce blocage est proportionnelle à la dose de théophylline, (FIG. 5). Nous devons donc caractériser son action par le pourcentage d'inhibition à l'équilibre et par le retard avec lequel cet équilibre est

atteint. Ces deux propriétés varient en fonction du rapport des concentrations $\frac{\text{théophylline}}{\text{acétylcholine}}$ (FIG. 2, TABL. III), mais l'effet sur l'état d'équilibre est plus marqué que celui du retardement. La fig. 5 montre l'action de la théophylline sur la cholinestérase « vraie » du cerveau de rat. A la dose de

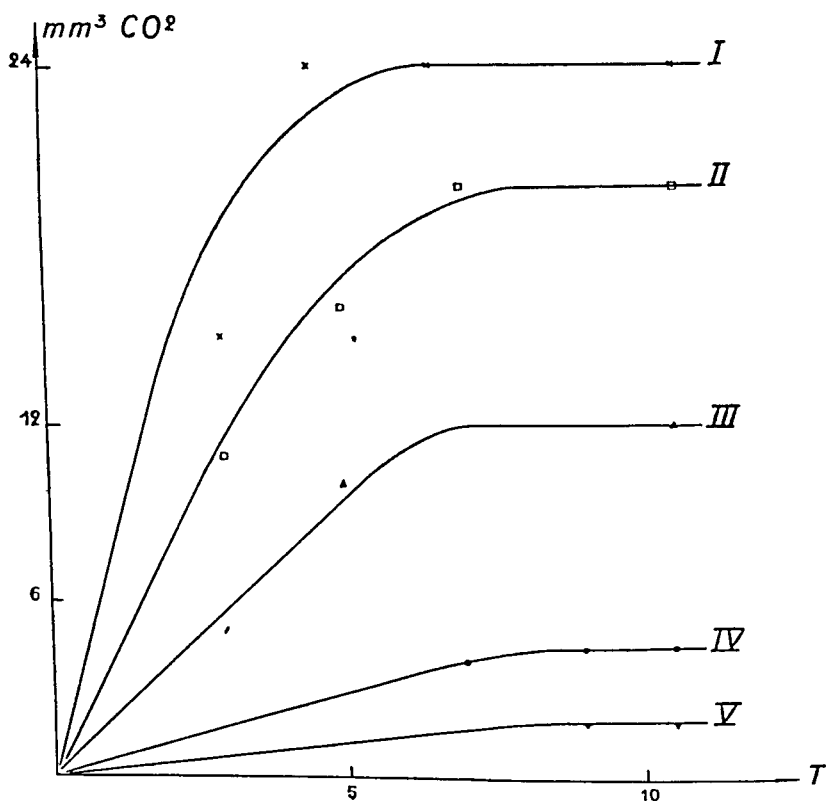


FIG. 5

Inhibition de l'hydrolyse de l'acétylcholine par la cholinestérase du cerveau de rat en présence de Théophylline.

- I. Croix : Ac.Ch. 5 mgrs. % (Témoin).
 - II. Carrés : Ac.Ch. 5 mgrs. % + Théophylline 50 mgrs. %
 - III. Triangles pointe en haut : Ac.Ch. 5 mgrs. % + Théophylline 100 mgrs. %
 - IV. Points : Ac.Ch. 5 mgrs. % + Théophylline 250 mgrs. %
 - V. Triangles pointe en bas : Ac.Ch. 5 mgrs. % + Théophylline 500 mgrs. %
- Abcisses : Temps en minutes.

25 mgrs. % la théophylline s'est encore montrée faiblement active. A la concentration de 10 mgrs. % elle est sans action. Donc aux faibles doses, l'ordre d'activité s'établit comme suit :

Théobromine > Caféine > Théophylline = 0.

Sur la « pseudo » cholinestérase, la théophylline a une double action identique à celle que nous venons de décrire. Il est à noter que comme pour la caféine, l'action sur la « pseudo » est un peu moins prononcée

que sur la cholinestérase « vraie ». (FIG. 2) et qu'à la dose de 10 mgrs % la théophylline cesse d'agir, (TABLEAU : III) d'où :

Caféine > Théobromine = Théophylline = 0.

Dans le cas de la théophylline, qui semble bloquer réellement une partie des deux types de cholinestérase, nous retrouvons le phénomène que nous avons signalé à propos de la caféine et de la pseudocholinestérase : la courbe d'inhibition est identique, que l'inhibiteur ait été ajouté à la cholinestérase au moment de la réaction d'hydrolyse ou plusieurs heures avant celle-ci. La même remarque vaut pour la caféine et la théobromine sur la cholinestérase vraie. Ces expériences ont été faites avec 100 mgr % d'inhibiteur et 10 mgrs % d'acétylcholine.

DISCUSSION

Il nous semble que dans les expériences que nous avons relevées dans la littérature, le facteur « temps » a été négligé, alors qu'il était particulièrement important dans le cas de la caféine et de la théobromine, qui ne font que retarder la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine. Si nos expériences confirment l'action de la caféine sur l'estérase du cerveau de rat aux doses utilisées par BERNHEIM et BERNHEIM (10), nous ne pouvons retrouver les résultats de KAHANE et LEVY (9), ni ceux de CASIER (14). Signalons toutefois que CASIER a utilisé des concentrations différentes d'acétylcholine que celles employées dans nos expériences (1). Ce fait explique la divergence des résultats. Bien que l'action de la caféine soit légèrement moins intense sur la « pseudo » cholinestérase que sur la cholinestérase « vraie », nous n'avons pu retrouver les résultats de ceux qui lui attribuent une action insignifiante ou nulle sur la cholinestérase du sérum (11, 12, 13). A lire attentivement ZELLER et BIESSIEGER (13), qui dans leurs conclusions nient à la caféine toute action sur la cholinestérase du sérum humain, on s'aperçoit dans leurs protocoles d'expériences qu'ils ont trouvé une inhibition de 4 %. Or ils ont travaillé dans des conditions où le rapport $\frac{\text{Conc. mol. acétylcholine}}{\text{Conc. mol. caféine}}$ est égal à 1,1 ce qui fait prévoir, d'après les mesures que nous signalons au Chapitre I paragraphe a) de cet article, une inhibition très faible. Leurs résultats rencontrent donc les nôtres dans ce cas particulier, encore que leur conclusion nous paraisse abusive. L'inactivité de la 1.3.7 triméthylxanthine sur l'estérase du sérum humain aux doses thérapeutiques nous paraît normale en raison de la faiblesse de ces doses (15).

(1) Communication personnelle.

Il est remarquable que ces trois corps, voisins par leur constitution chimique et leurs actions pharmacologiques agissent de façon fort différente sur les cholinestérases : la caféine ralentit l'hydrolyse de l'acétylcholine par les deux types de cholinestérase; la théobromine a la même action sur la « vraie » cholinestérase et est sans effet sur la « pseudo »; l'effet retardateur de la théophylline est faible, mais elle bloque effectivement une partie des deux estérases et détermine un équilibre de réaction nouveau, témoignant d'une sérieuse action inhibitrice.

Quant à savoir quel rôle cette activité anticholinestérasique peut avoir en pharmacologie, force nous est de reconnaître que notre appareillage de Warburg ne nous a pas permis de travailler avec sûreté sur des doses d'acétylcholine plus faibles que 5 mgrs. %. Toutefois, comme pour une dose de méthylxanthine donnée, le pouvoir inhibiteur est d'autant plus fort que la dose de substrat est plus faible, on peut présumer que l'action anticholinestérasique sur des préparations isolées n'est pas négligeable : pour OURY (3) et LAMALLE (4), travaillant sur le rectus de grenouille et l'oreillette isolée de tortue, avec des doses d'acétylcholine de 25 à 100 μ grs % et des concentrations de méthylxanthines de 2,5 à 10 mgrs. %, l'action anticholinestérasique paraît certaine, encore qu'il résulte de la discussion OURY (3) que cette propriété n'est pas entièrement explicative des phénomènes observés. En outre, l'ordre d'activité sur ces préparations est caféine > théobromine > théophylline, qui n'est pas celui de l'activité anticholinestérasique, ni sur la « pseudo », ni sur la vraie cholinestérase. Les expériences concernant l'influence des méthylxanthines sur l'action cardiaque du nerf vague (1, 2, 4) montrent que de faibles doses de caféine, de théobromine et de théophylline augmentent les effets de la stimulation du X, tandis que de fortes doses la diminuent, alors que l'effet anticholinestérasique est augmenté aux fortes doses et que l'action anticholinestérasique maximale de l'ésérine accentue les effets modérateurs du vague. D'autres arguments, développés par FREDERICQ et BACQ (1, 2), montrent encore que la propriété anticholinestérasique ne suffit pas à rendre compte des faits. Enfin, sur la préparation sciatique-couturier de grenouille, GOUTIER (7) a montré que les méthylxanthines « potentialisent » la contraction. Or, si aux doses qu'il a employées, 10 mgrs. %, l'ordre d'activité est le même que sur la cholinestérase : théobromine > caféine > théophylline, remarquons qu'à 10 mgrs. % la théophylline n'inhibe plus l'hydrolyse de faibles doses d'acétylcholine. Enfin, si la théobromine et la caféine 1/10.000 allongent le temps d'hydrolyse de l'acétylcholine, elles ne le font pas au point de rendre la réponse musculaire répétitive (8). Sur la préparation du

diaphragme isolé de rat stimulé par le nerf phrénique, l'ordre d'activité potentiatrice est le suivant : caféine > théobromine > théophylline (19), qui ne correspond pas à celui de l'activité anticholinestérasique. Donc dans les expériences (7, 19) l'activité antiestérasique de la caféine et de la théobromine paraît certaine, mais n'explique pas les résultats obtenus.

RÉSUMÉ

1) L'action anticholinestérasique de la caféine, de la théobromine, et de la théophylline a été étudiée sur le sérum de cheval et le cerveau de rat, en faisant varier largement les doses de substrat, d'inhibiteur et le temps d'observation au Warburg.

2) La caféine agit sur les deux types de cholinestérase en ralentissant la vitesse de la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine. Son activité sur la « pseudo » cholinestérase est un peu moins marquée que sur l'estérase vraie. Dans les deux cas la réaction se poursuit jusqu'au même équilibre, que celui qu'on observe dans le manomètre témoin.

3) La théobromine est sans action sur la « pseudo » cholinestérase. Sur la cholinestérase « vraie », son action est du même type que celle de la caféine.

4) La théophylline bloque les cholinestérases et amène la réaction d'hydrolyse à un nouvel équilibre. Son action est plus faible sur la « pseudo » cholinestérase que sur la cholinestérase « vraie ».

5) L'ordre d'activité des méthylxanthines sur la cholinestérase « vraie » pour des doses au-dessus de 25 mgrs. % est :

Théophylline > Théobromine > Caféine

A 10 mgrs. % la théophylline cesse d'agir et on a :

Théobromine > Caféine > Théophylline = 0.

6) L'ordre d'activité des méthylxanthines sur la pseudocholinestérase est le suivant :

Théophylline > Caféine > Théobromine = 0.

A la dose de 10 mgrs. % la théophylline est sans action et on observe l'ordre d'activité suivant :

Caféine > Théobromine = Théophylline = 0.

7) Le degré d'inhibition des cholinestérases par les méthylxanthines est essentiellement fonction du rapport $\frac{\text{concentration Ac. Ch.}}{\text{concentration Inhibiteur}}$, et il est fonction du temps.

8) Le temps de contact entre les méthylxanthines et les deux types de cholinestérase n'influence pas l'inhibition du ferment.

9) Les résultats sont confrontés avec les données de la littérature et la discussion de quelques expériences pharmacologiques montre que le pouvoir anticholinestérasique des méthylxanthines n'explique pas l'activité biologique de ces substances.

Nous tenons à remercier le Pr. M. FLORKIN de l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire, et le Pr. M. J. DALLEMAGNE de l'intérêt avec lequel il a suivi nos recherches.

BIBLIOGRAPHIE

1. — H. FREDERICQ et Z. M. BACQ. Action des dérivés xanthiques sur les systèmes nerveux autonomes. *Arch. Int. Pharmacodyn. et Thérap.* 1938, LX, 423. (cfr : Bibliographie).
2. — H. FREDERICQ. Blocage des synapses du pneumogastrique cardiaque par la caféine. XVIIth International physiological congress. Oxford. 1947. p. 322.
3. — A. OURY. Modification par la caféine des effets de l'acétylcholine sur le cœur de tortue et le muscle strié de grenouille. *Arch. Int. de Physiol.*, 1937, XLIV, 488.
4. — A. LAMALLE. Action des dérivés puriques sur le pneumogastrique cardiaque de la tortue et sur les effets cardiaques de l'acétylcholine. *Arch. Int. de Physiol.*, 1941, LI, 353.
5. — R. GOUTIER. Sensibilisation au potassium par les méthylxanthines. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, CXXI, 1596.
6. — R. GOUTIER. Sensibilisation par les méthylxanthines aux effets inhibiteurs du Potassium. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, CXLII, 711.
7. — R. GOUTIER. Potassium et méthylxanthines. *Journ. de Physiol.*, 1948, XL, 196 A.
8. — G. COPPEE et R. GOUTIER. Action des méthylxanthines sur les potentiels d'action des nerfs et des muscles striés de batraciens. *Arch. intern. Physiol.*, 1948, LVI, 177.
9. — E. KAHANE et J. LEVY. Inhibition de l'hydrolyse de l'acétylcholine par le sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, CXXI, 1596.

10. — F. BERNHEIM et M. L. C. BERNHEIM. Action of drugs on the cholinesterase of the brain. *J. of Pharm. and exp. Thérap.*, 1936, LVI, 427.
11. — D. NACHMANSOHN et H. SCHNEEMANN. On the effect of drugs on cholinesterase. *J. biol. Chem.*, 1945, CLIX, 239.
12. — A. DENYS et J. LEVY. Inhibition de la cholinestérase spécifique et de la pseudocholinestérase. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, CXLI, 653.
13. — E. A. ZELLER et A. BIESSIEGER. Ueber die Cholinesterase des Gehirns und der Erythrocyten. *Helvet. Chim. Acta.*, 1943, XXVI, 1619.
14. — H. CASIER. Action de diverses substances sur les cholinestérases sanguines. *Arch. int. Pharmacodyn. et Thérap.*, 1948, LXXVII, 58.
15. — F. J. SCHÜTZ. An effect of Barbiturates on serum cholinesterase. *J. Physiol.*, 1943, CII, 259.
16. — R. AMMON. Die fermentative Spaltung des Acetylcholins. *Pflüger's Archiv.*, 1934, CCXXXIII, 486.
17. — E. KAHANE et J. LEVY. Sur l'hydrolyse diastasique de l'acétylcholine par le serum. *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 1936. p. 781. Séance du 24 février.
18. — B. MENDEL et H. RUDNEY. On the type of cholinesterase present in brain tissue. *Science*, 1943, XCVIII, 201.
19. — M. GOFFART et R. GOUTIER. (Expériences inédites).

DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY ABBOTT RESEARCH LABORATORIES
NORTH CHICAGO, ILLINOIS

PHARMACOLOGIC STUDIES OF A NEW ANTIHISTAMINE COMPOUND (N-(p-CHLOROBENZHYDRYL)-N'-METHYL PIPERAZINE HYDROCHLORIDE)

BY

L. W. ROTH, R. K. RICHARDS AND I. M. SHEPPERD

(Received for publication 11-4-1949).

In the screening of compounds for antihistaminic activity, certain members of a series of piperazines showed significant power to inhibit the action of histamine on the blood pressure of the cat. Further testing of this group, all synthesized by HAMLIN *et al* (1) yielded one which possessed satisfactory antihistaminic characteristics, and at the same time promised to excel in one important phase, that of prolonged duration of action.

This outstanding representative of the group was N-(p-chloro-benzhydryl)-N'-methylpiperazine hydrochloride (hereafter referred to as AH-289) which possesses the following characteristics.

ANTIHISTAMINIC ACTIONS

Cat blood pressure. In doses of less than 1 mg/kg AH-289 exerts only a moderate, transient depressor effect in the anesthetized cat. As the dose is increased, a greater depression occurs, yet with 10 mg/kg, the return to a normal blood pressure is complete within 5 minutes. When given in doses of 10 mcgr/kg intravenously, to an anesthetized animal previously standardized to exhibit a reproducible depressor response to 0.5 mcgr/kg of histamine (as base), this fall in blood pressure is inhibited by as much as 70 %. With higher doses the depressor response to this amount of histamine can be virtually abolished. The duration of protection was noted first in this test, since a dose of

10 mcgr/kg provided gradually diminishing but detectable protection for as much as 15 minutes or more. This stood out in contrast to most of the ethylenediamine type of antihistaminics, whose antagonism to histamine can seldom be observed for longer than 5 minutes.

AH-289 produces a slight potentiation of the pressor response to epinephrine, though not as pronounced as with most ethylenediamine antihistaminics.

Isolated guinea pig ileum. Early tests with AH-289 were made on strips of guinea pig ileum suspended in a constant temperature bath maintained at 37.5° C., with air bubbled through the solution in the chamber. The strip was never exposed to the atmosphere, as the chamber was designed to wash through with fresh solution, providing a final volume of 20cc after complete run-off through the overflow outlet. Atropinized (0.5 gamma/cc) Tyrode solution was used, as this concentration of atropine has little influence on the histamine response and yet provides a more quiescent muscle preparation. Drugs were introduced along the side of the chamber by means of a 3 inch, 27 gauge needle.

The customary procedure was to add 0.1 gamma of histamine (calculated as the base) with subsequent washing until reproducible successive responses were obtained from the contracting strip, allowing 30 seconds for the histamine to act. Then the antihistaminic was added, and without washing the same amount of histamine was introduced. In successive trials, varying amounts of the antihistaminic were chosen until one was found which reduced the contraction to the standard histamine dose by at least 70 %. In several tests, the potency of the drug seemed to be disproportionally weaker than its activity in the cat had indicated. Only after subsequent tests on intact guinea pigs (to be discussed later) was the source of the discrepancy discovered, namely slow onset of action.

The antihistaminic was again tried, allowing a longer time for it to penetrate the muscle before the histamine was added. After 2 minutes of contact, its inhibitory power was considerably greater, and after 5-10 minutes contact, it was still more potent. In a concentration of 0.1 to 0.5 mcgr. in the chamber (0.005 to 0.025 mcgr/cc) allowed to act for 5 minutes, AH-289 reduced the subsequent standard histamine contraction, and in the higher dose this reduction usually exceeded 70%.

Antispasmodic activity. AH-289 was assayed on isolated rabbit intestine to determine if it was specifically antihistaminic in its action on smooth muscle. Its potency against acetylcholine was found to be less than 1/100th that of atropine.

Protection against histamine in the intact guinea pig. The LD₁₀₀ of intravenous histamine has been determined frequently on our stock of animals to be 0.4 mg/kg (as the base). Earlier observations on the protective action of AH-289 were disappointing, since relatively large doses were required to protect a large proportion of the animals against the subsequent injection of 0.4 mg/kg of histamine. As the experiments progressed, a higher incidence of survival was noted among the animals which for any reason were given the histamine late — 45 to 60 minutes after the antihistaminic. The normal procedure which had been arbitrarily standardized involved the injection of the histamine 15 to 30 minutes after the protective dose of any antihistaminic being tested. Repeating the tests with new series of guinea pigs and allowing a full hour to elapse between the injection of AH-289 and the shocking dose of histamine produced a remarkable increase in the percentage survival of the animals. On this basis the protective action of AH-289 was again explored, and found to be complete in a dose as low as 0.1 mg/kg when given intraperitoneally, or 2.5 mg/kg orally, against the LD₁₀₀ of histamine. The results are summarized in table I.

TABLE I
Protection by AH-289 against the lethal effects of histamine I-V in guinea pigs.

Dose of AH-289 (mg/kg)	Route of Administration	Time Before Histamine Injection	Histamine Dose (Multiples of LD ₁₀₀)	Animals Used	Animals Surviving*	Percent Protected
1	I-P	15-30 min.	2	6	0	0
3	"	15-30 min.	2	4	1	25
5	"	20	1	9	9	100
** (Same animals)		210	1	9	7	78
0.1	I-P	20	1	5	1	20
0.3	"	20	1	2	2	100
0.5	"	20	1	3	3	100
20	"	90	100	6	1	16
20	"	90	75	2	0	0
20	"	90	50	2	2	100
5	Oral	90	1	3	3	100
10	"	90	1	3	3	100
15	"	60	1	2	2	100
25	"	60	1	2	2	100
50	"	60	1	2	2	100
** (all above orals)		180	1	12	12	100
" " "		360	1	12	12	100

* All survivors were held for several days. When again shocked with the LD₁₀₀ of histamine, all died.

** These animals were retested without additional AH-289 administration.

Duration of protection. Because of the relatively slow onset of protection, tests on duration of action were indicated. Several dose levels were tried, and the animals were tested at various intervals from 6 to 48 hours after administration of AH-289 by intravenous injection of one LD_{100} of histamine. The results of this series are summarized in table II, and it will be seen that with moderate doses, appreciable protection still exists after 24 hours, while with a higher dose (approaching the toxic level) there is protection apparent even at 48 hours. It should be pointed out that some animals surviving the test dose of histamine were again given the same dose later. The probability of

TABLE II
Duration of protection of AH-289 against intravenous histamine in guinea pigs.

Dose of AH-289 (mg/kg)	Route of Administration	Time Before Histamine Injection	Histamine Dose (Multiples of LD_{100})	Animals Used	Animals Surviving*	Percent Protected
0.1	I-P	90 min	1	4	4	100
	(same animals)**	180	1	4	4	100
	» »	360	1	4	4	100
1	I-P	18 hrs	1	4	0	0
3	»	18	1	4	2	50
2.5	Oral	9	1	5	4	80
	(same animals)	12	1	4	2	50
5	Oral	6	1	4	4	100
5	»	9	1	5	4	80
	(same animals)	12	1	4	3	75
10	Oral	6	1	3	3	100
5	»	12	1	5	1	20
	(survivor)**	24	1	1	1	100
10	Oral	12	1	5	4	80
	(survivors)	24	1	4	3	75
10	Oral	18	1	4	1	25
20	»	18	1	4	3	75
20	»	24	1	4	4	100
30	Oral	24	1	4	3	75
50	I-P	48	1	5	2	40
50	»	24	1	5	5	100
	(same animals)	48	1	5	4	80
	(survivors)	68	1	4	2	50
50	I-P	42	1	5	3	60
	(survivors)	68	1	3	1	33

* All survivors were held for several days. When again shocked with the LD_{100} of histamine, all died.

** « Same animals » or « survivors » were followed continuously, with no additional AH-289 given.

development of an increased resistance to histamine or the occurrence of some non-specific type of resistance was tested by subjecting all "protected" survivors to the same dose of histamine several days later. All succumbed with typical symptoms, which would indicate that the protection was actually due to the effects of the antihistaminic drug AH-289. Further evidence of this prolonged action will be presented below in a discussion of the human experimental testing of AH-289.

Antianaphylactic action. Guinea pigs were passively sensitized with 5 cc/kg rabbit anti-egg-white plasma given intravenously. The controls were shocked after 2 hours with 0.4 cc of a 1 : 8 dilution of fresh egg white. The incidence of anaphylactic death was 87 % in this series. The experimental animals were similarly injected with the same dose of anti-egg-white plasma, one hour later they were given an intraperitoneal dose of AH-289, and one hour after that they were challenged with the same dose of egg white. With a protective dose of 3 mg/kg AH-289 seven out of eleven survived. With 5 mg/kg, seven out of ten survived. Tests on duration of protection have not been attempted, mainly because of the uncertainty as to the effect pretreatment with the drug might have on the degree of passive sensitization achieved by the usual techniques, after the drug was already present in the animal tissues.

Protection of human against histamine flares. Modification of the histamine wheal and flare reaction by the prior oral administration of an antihistaminic drug has been observed by WAREMBOURG et al (2), FRIEDLAENDER and FEINBERG (3) and others. A modification was employed which involved the cutting of the skin by a special instrument. A length of 16 gauge hypodermic needle tubing was ground flat at one end, and the tip was then whetted around the periphery to provide a sharp cutting edge. The opposite end was provided with a round knob and adjustable stop, so that when the tubing was passed through the center of a plastic rod, the cutting edge could be projected to any predetermined distance beyond the surface of the plastic. With several quick twirls of the knob, a relatively painless, usually bloodless, cut of uniform diameter (1 mm) and depth of choice, could rapidly be made on any skin surface. The histamine solution (in dilutions of 1 to 2, 4, 8, 16, or 32 thousand) was then applied in a drop of constant volume directly over the cut, and the skin was gently pulled from both sides of the area to facilitate penetration of the histamine. After 5 minutes the histamine was wiped off, and at 15 minutes, the limits of the wheal and flare were traced with a ball-point pen. By pressing a sheet of paper directly over the tracing, the inked lines were transferred as accurate

mirror images, and the entire procedure was extremely simple and rapid.

Using this technique, nine volunteer subjects were first assayed for a control value before taking AH-289, all test cuts being made on the back, in the area lateral to the thoracic vertebrae. The tracings were transferred, and each person was then given one 50 mg. tablet of the drug. At intervals after the drug was taken, the test was repeated, in each case using five serial dilutions in the range from 1 : 2000 or 1 : 4000 onward. Earlier tests with a small dose of 25 mg. AH-289 had not been sufficiently critical but had established the onset of activity at about 2 hours, so no tests were done before at least 2 hours had elapsed. In most of the subjects, there was a marked reduction of the size of the flare even after 11-12 hours, some at 18 hours, and a slight but appreciably smaller response even at 24 hours. These same subjects had served previously in the testing of methylpyrilene (Thenylene) and tripeleminamine (Pyribenzamine), and all had shown a flare response equal to or greater than the control values within 8 hours after taking these drugs. The apparently greater duration of action may reduce the total daily dose as compared with the commonly used antihistaminics.

Other effects of AH-289. Effects on EEG and ECG in the rabbit. Simultaneous electrocardiographic and electroencephalographic records were taken on a rabbit before and after the intravenous injection of 10 mg/kg of AH-289. After the first injection, there was a 30 % slowing of heart rate, but no change in the EEG or ECG. A second injection of the same dose 30 minutes later produced no change in heart rate, and in the ECG minor changes were observed for a few minutes. In the EEG a short burst of spikes and high voltage waves occurred, but no other changes were noted. Thirty minutes after the second dose, a third injection of 10 mg/kg of AH-289 produced no significant changes in the EEG, minor brief ECG changes, and then a return to normal. In no case was respiration abolished.

In contrast, the intravenous injection of *one* dose of 10 mg/kg of any of several ethylenediamine antihistaminics represents a dose lethal to nearly half of the animals and which would probably produce convulsions in all.

Local anesthetic activity. Injection of 0.5 - 1 % solution of AH-289 intradermally in the guinea pig produced approximately the same degree of local anesthesia as procaine in the same concentration, followed by moderate tissue irritation. In the rabbit eye, corneal anesthesia was definite, but some degree of irritation was produced in the concentration used (1 %).

Characteristics of ophthalmic solutions. AH-289 was made up in concentrations of 0.5 and 0.25 per cent, in solutions isotonic with tears. After preliminary trials in rabbits, ten human subjects were tested, with a commercial preparation of Antistine (0.5 %) used as a control in the opposite eye. With the 0.5 % solution of AH-289 all subjects noted a marked stinging or burning sensation, considerably more intense than the sensation produced by Antistine, but the local anesthetic properties of AH-289 suppressed this sensation within a minute or two, whereas the milder sensation with Antistine persisted for several minutes. With the 0.25 % AH-289 the sensation was slightly stronger than with 0.5 % Antistine, but disappeared much more rapidly. There was no evidence of residual irritation with either preparation.

Sedative action. Following the technique described by WINTER (4), two series of mice were tested. One received only 100 mg/kg of Evipal, intraperitoneally, and served as the control group. The other group received a pretreatment of 5 mg/kg AH-289, intraperitoneally, 15 minutes before the injection of 100 mg/kg of Evipal. Time of awakening was determined for each animal. For the controls (30 animals) the mean awakening time was 32.6 ± 2.03 minutes, and for those receiving AH-289 also (30 animals), the time was increased to 38.5 ± 1.71 minutes. Statistical analysis showed the difference to be of doubtful significance, with a P value greater than 0.02. As compared to the data of Winter, who noted approximately 10 % increase in waking time with Pyribenzamine and Neoantergan and about 40 % increase with Benadryl and 3277 RP, AH-289 apparently produced approximately an 18 % increase, which would indicate that its sedative action may lie intermediate between these two groups of compounds, more nearly approaching that of the first. This agrees with the limited series of human subjects used in the histamine flare test, where subjective symptoms were relatively mild, if experienced at all.

TOXICITY

Acute toxicity. Table III summarizes the results of acute toxicity tests on mice, rats, guinea pigs, cats and dogs. In general, the toxicity is of the same order as many other antihistaminic drugs now available, except in the case of the intravenous administration in mice, in which it is considerably less toxic than many others.

Chronic toxicity. Guinea pigs. A group of 10 guinea pigs were placed on a diet containing 0.2 % AH-289. At 3 weeks three animals

TABLE III

Acute toxicity of AH-289.

Animal	Route of Administration	Dose mg/kg	Animals Used	Number Fatal	Percent Mortality
Mouse	I-P	85	10	2	20
		95	10	1	10
		100	10	6	60
		150	10	9	90
		175	10	10	100
	I-V	20	10	1	10
		25	10	2	20
		30	10	3	30
		35	50	25	50
		40	30	16	53
		45	20	16	80
		50	10	8	80
	Subcu	100	10	0	0
		150	10	3	30
		200	20	11	55
		250	20	17	85
	Oral	150	10	1	10
		200	10	2	20
		250	20	7	35
		300	20	11	55
		400	20	17	85
Guinea Pig	I-P	50	10	0	0
		75	20	13	65
		100	20	10	50
		125	10	6	60
		150	10	7	70
		200	3	1	33
		250	3	3	100
Rat	I-P	75	16	3	18
		100	16	8	50
Cat	I-P	75	4	2	50
		100	4	2	50
Dog	I-P	100	3	1	33
		125	3	1	33
		150	3	3	100

were sacrificed, examined, and specimens taken for histological study. At 5 weeks three more animals were similarly studied. In no case was any abnormality noted in any of the tissues examined.

Dogs. Two dogs were given doses amounting to 10 mg/kg per day orally for a period of one month. At the end of this time blood count and urinalysis were normal, and histological sections showed no pathological changes. Two more animals have been on this same dose for over 4 months, and the experiment is still in progress.

Rats. Groups of rats, 3 to 5 weeks old, were placed on diets in which AH-289 was incorporated in concentrations of 0.05, 0.01 and 0.005 per cent of the diet. Sixteen animals were started for each drug level and sixteen controls were on the same diet without the drug. After three weeks representative individuals were sacrificed, and a histological study was made of all organs. After ten weeks several more were sacrificed and examined, while the remainder of the groups are still continuing on the drug regime. It was found that the tissues of the animals on the diet containing 0.005 % AH-289 were indistinguishable from the normal controls. The animals receiving 0.01 % were normal in weight and growth, the liver sections showed borderline cytological changes as judged by occasional fatty changes, impaired staining ability, etc., but some individuals did not differ from controls. In the animals on the 0.05 % drug level the liver changes were more pronounced, as evidenced by granular appearance of the cytoplasm, impaired staining ability and moderately increased fat content. No significant increase in liver damage was observed in the 10 week representatives over those sacrificed at 3 weeks, indicating that the drug did not have any outstanding cumulative toxicity.

DISCUSSION

Although considerable detail has been devoted to this one compound, it should be noted that over 50 other piperazines have been screened for similar activity. The non-halogenated congener, N-benzhydryl-N'-methylpiperazine hydrochloride, was one of the first to be tested. Its toxicity was not less than that of AH-289, and its potency, as assayed by the cat blood pressure method and the guinea pig ileum, was of a lower order. The same situation held true for the other piperazines tested in that they were less promising in one or more important criteria.

The application of antihistaminics to the field of allergy depends on the assumption that their histamine antagonism as determined by laboratory

testing on animals or human subjects may correlate to some extent with their potential efficacy in certain allergic manifestations. The outstanding experimental advance contributed by AH-289 is its apparent prolonged duration of action. The encouraging results obtained with this drug in animal experimentation justified clinical trial, and the use of AH-289 in a variety of allergic conditions will be reported by others elsewhere.

SUMMARY

N-(p-chlorobenzhydryl)-N'-methylpiperazine hydrochloride (AH-289) is a potent antihistaminic agent as demonstrated by its antagonism to the effects of histamine on the isolated guinea pig ileum, cat blood pressure, in the intact guinea pig, and on the skin flare in human subjects.

It has been shown to potentiate the pressor activity of epinephrine. It possesses the ability to antagonize anaphylactic shock in the passively sensitized guinea pig.

Its acute toxicity has been determined in mice, rats, guinea pigs, cats and dogs. Chronic toxicity studies on rats, guinea pigs and dogs indicate that, in doses equivalent to several times the clinical level, no significant alteration in the hematological or histological findings can be observed. In higher doses, in rats only, beginning liver impairment occurs.

It recently has been learned that this compound has been independently synthesized and tested pharmacologically, in the form of the dihydrochloride, by Burroughs-Wellcome & Co., Tuckahoe, N.Y.

BIBLIOGRAPHY

1. — HAMLIN, K. E., WESTON, A. W., FISCHER, F. E. and MICHAELS, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* (In press).
2. — WAREMBOURG, H., LINQUETT, M., and MACHON, C. R. *Soc. Biol. Paris*, 1944, 138, 147.
3. — FRIEDLAENDER, S. and FEINBERG, S. M. *J. Allergy*, 1946, 17, 129.
4. — WINTER, C. A. *J. Pharm. and Exp. Therap.*, 1948, 94, 7.

LABORATORY OF PHYSICAL BIOLOGY, EXPERIMENTAL BIOLOGY & MEDICINE
INSTITUTE. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. U. S. PUBLIC HEALTH
SERVICE, BETHESDA 14, MARYLAND

STUDIES ON AEROSOLS

VI. Effect of aluminum powder and of NaCl aerosols upon the pulmonary deposition of silica dust (Long Exposure).

BY

L. DAUTREBANDE, W. C. ALFORD, D. A. IRWIN,
E. R. MITCHELL, E. C. THOMPSON, F. L. WEAVER
AND E. J. WOOD

(Received for publication 24-2-1949).

In preceding papers (1, 2) it has been shown that aerosols of water or water solutions of 5 to 10 % NaCl coat and agglutinate fine dust particles when dispersed concomitantly in the atmosphere. Thus initial dispersion of fine dust mixed with an aerosol (1) resulted in the formation of aggregates averaging 5 to 7 microns with some as large as 30 microns.

Since the aggregation into large particles will result in 1) increased rate of settling out and 2) preferential deposition of large aggregates in the upper respiratory tract due to centrifugal action of changes in direction of airflow, the hypothesis was brought forward that aerosol dispersion in dusty atmospheres will reduce the amount of dust carried into the lungs, particularly into the alveolar regions.

Experiments to demonstrate this effect (1, 2) showed that Willemite dust, which could be detected by its fluorescence in ultraviolet light, was indeed less prevalent in the lungs of rabbits when the dust atmosphere was treated with an aerosol of either water or sodium chloride

(1) The mean micellary diameter of the dust was 0.5 micron and the mean micellary diameter of the aerosol was 0.46 micron under optical microscope and circa 220 Angstrom units under the electron microscope (5).

solution. It was further evident (2) that in short exposures, the effect of the salt aerosol was more marked than that of water, which is credited to the fact that salt aerosols form larger aggregates than water aerosols (5).

It was also observed in the animals subjected to the NaCl aerosol Willemite mixture, that the duration of the exposure could be doubled without the animals showing more dust in their lungs than those which had been subjected to the dust alone for half as long a period. In the animals sacrificed eight days after one exposure of 5 hours, the lungs of those exposed to the dust alone showed a greater quantity of dust than that observed in the animals exposed to dust treated with NaCl aerosols.

Estimation of the quantity of Willemite visible under ultraviolet light presents certain disadvantages. The particles visible at the low magnification necessitated by this technique are relatively large and are probably aggregates. Moreover, the grading of the impregnation of the lung's dust always involves a certain degree of subjective error, and the concentration of dust required for an easily discernible impregnation of the lungs was rather high: viz. 80 mg. per cubic meter of air.

It was therefore necessary to verify whether the effect observed in an exposure lasting only a few hours will also persist in daily repeated exposures. If true, then it must be expected that the aerosols of NaCl would delay the appearance of the silicotic lesions.

The following experiments of longer exposures were undertaken for this purpose:

1) A first series of rabbits and rats was exposed for 6 hours a day, 5 days per week, to aerosols of NaCl alone, at the rate of circa 70 mg. per cubic meter of air.

2) A second series of rabbits and rats (1) was exposed for 6 hours a day, 5 days per week, to an atmosphere containing circa 45 mg. of silica with 2 % iron (2).

3) Another series of animals was exposed under the same conditions to the same atmosphere of silica plus aerosols of NaCl at a concentration of circa 70 mg. per cubic meter of air.

(1) As often happens in experiments of this kind, an epidemic broke out among the rats which, from the first, died at a regular rate from infectious pneumonia. They cannot, therefore, be taken into account.

(2) The iron contained resulted from the grinding of the silica in an iron disc mill (BRAUN) and served two incidental purposes: first, it served as a tracer element when sections of the lung were later stained by PERLS' method (6) and, second, the concentration of iron in the silica dust approached that found in mines whose ores, in dust form, have been known to cause silicosis (3).

generator tube, 1 meter in length and 2 cm. in diameter, is mounted on a constantly rising platform (K), in accordance with the technique described by H. H. SCHRENK (4). Into this tube is inserted a second tube (L) of 1 cm. inside diameter, through which the dust is drawn up by the Venturi effect (M) produced by compressed air (fed through a constant pressure valve) (B_1).

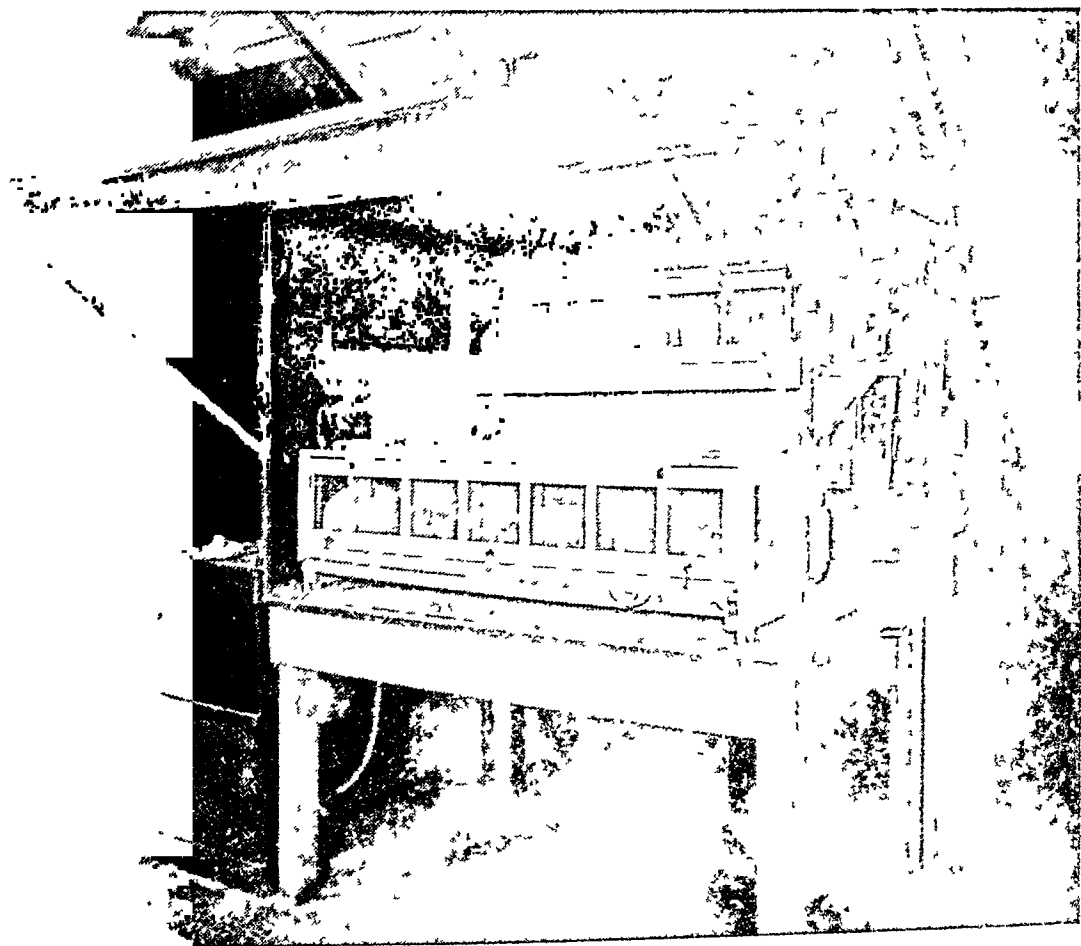


FIG. 2

One of 5 exposure chambers (silica alone). Inside view.

After leaving the dust generator, the larger dust particles, making up about 60-75 % of the total weight, are centrifugally separated from the air stream by passage through a "cyclone" type separator. The "cyclone" (E) consists of a cylindrical tube 15 cm. in diameter and 54 cm. high. The dust-laden air enters the tube tangentially at the lower end and emerges from an outlet in the center of the conical top. Then the dust is bubbled through a 2-liter flask half full of water (F). In previous work it was observed that by this simple technique of washing the dust it was possible to separate out the majority of the larger par-

ticles; 96 % of the dust particles remaining being less than 1 micron in diameter.

From the washing flask (F) the dust passes directly to the exposure chamber (FIG. 2 and 3). Of the dust in the generator tube, only 3.4-4.6 % by weight succeeds in passing through the selector system and into the chamber (see TABLE I).

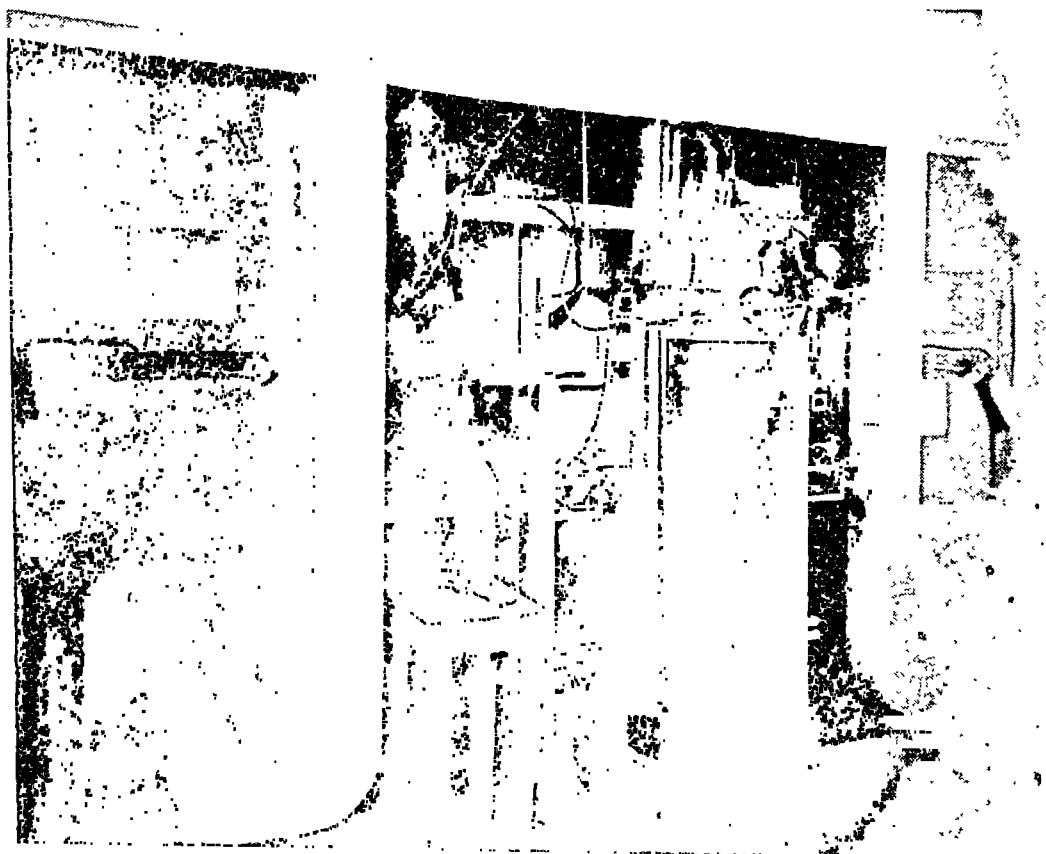


FIG. 3

Two of 5 exposure chambers (silica + NaCl aerosols, left chamber; silica + aluminum right chamber). Outside view.

An exhaust system is so regulated that a slight constant negative pressure is maintained within the chamber.

The same technique was used for the animals exposed to the silica dust with aluminum added; the silica being mixed thoroughly with McIntyre aluminum powder so as to contain 2 % of it by weight before introducing it to the generator tube. After passing through the selector system, the percentage concentration of the aluminum increases from 2 % to 6 %. This is probably due to the different physical states of the silica and aluminum.

For the production of silica dust plus aerosols of NaCl, the same technique is used (FIG. 3), except that the dust current is mixed with the aerosol current immediately beyond the outlet of the washing flask. (FIG. 1, *H*).

For the production of the aerosols, an M_3 (4×3) generator, previously described (5), was used. It had 12 jets, its water flow was circa 100 cm^3 per hour, under an airpressure of circa 22 pounds per square inch on the jets. The mean micellary size of the aerosols produced is ± 0.5 micron at 1125 X, and circa 220 Angstrom units under the electron microscope. An automatic syphon refilling apparatus main-

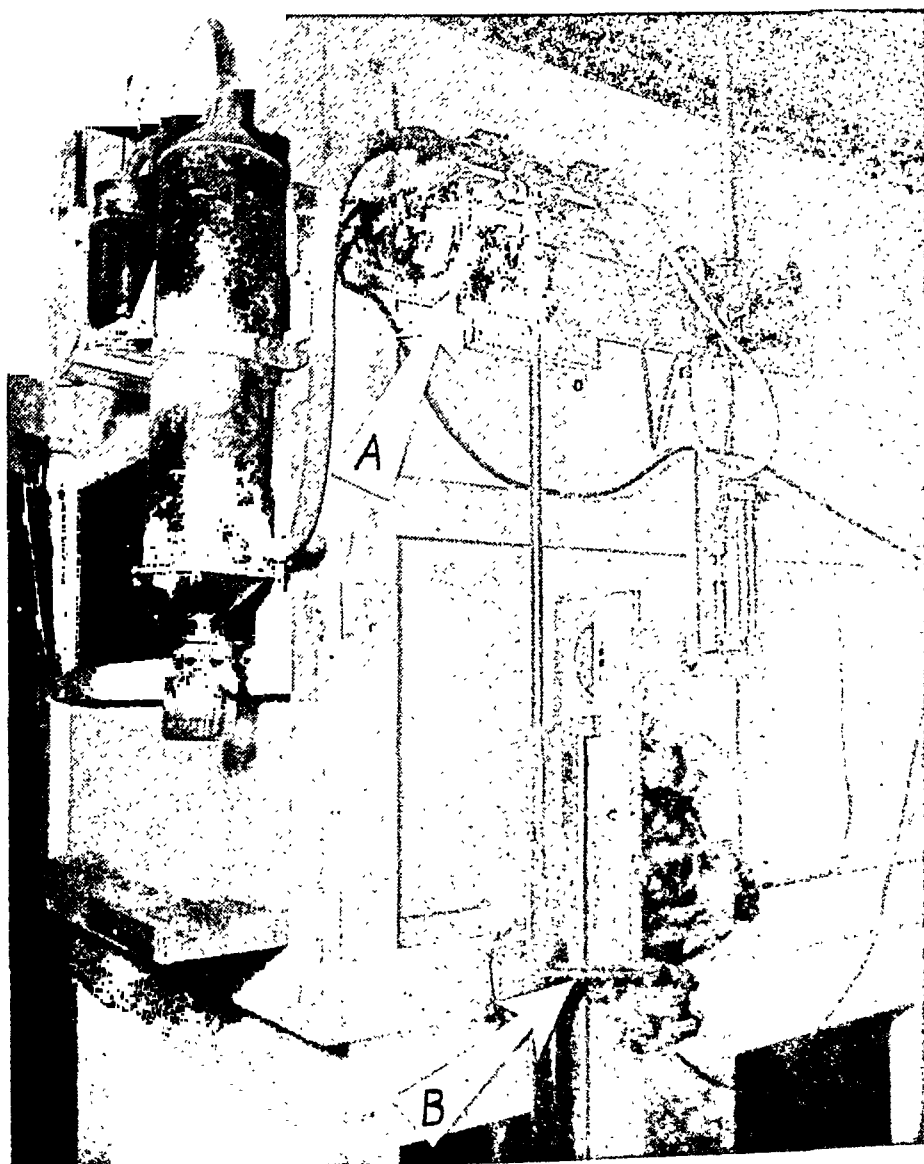


FIG. 4

Dust generator for aluminum powder. A) Rubber hammer for tapping the tube every 10 seconds. B) Rubber belt for constantly rotating the dust-containing tube.

tains a relatively constant level of the NaCl solution in the generator (FIG. 3). The concentration of this solution, 5 % at the start, does not exceed 11 % after 6 hours of dispersion.

In the three cases above, the quantity of dust-laden air (with or without aerosols) passing through the chamber was approximately 250 liters per minute. Before leaving the exposure chambers, the air was filtered through cotton waste, placed directly in front of the exhaust pump and cleaned at regular intervals.

For the dispersion of the dust aluminum alone, an additional device was required. The stickiness of this powder normally prevents its being carried along by the air current passing at the upper part of the generator tube. To avoid this, an apparatus was used consisting of a rubber hammer operated by a cam device for tapping the tube at 10-second intervals (FIG. 4, A). Moreover, the tube containing the dust was constantly rotated by means of a rubber belt (FIG. 4, B). With this device it was possible to obtain a regular current of aluminum dust. Every evening, however, it was necessary to clean out the deposit which accumulated in the narrow part of the tube each day.

Finally, the animals exposed only to the aerosols of NaCl were subjected to exactly the same conditions. The aerosols were produced by M_3 (2×3) generator described previously (5). It has 6 jets and dispersed 40 cubic centimeters of liquid per hour. The characteristics of the aerosols produced by this machine are exactly the same as those of the aerosols produced by the M_5 (4×3) machine.

The temperatures within the exposure chambers varied from 24° C. to 29° C. according to the weather, but were approximately the same in all chambers at any given time.

II. — *Dust and Aerosol Analysis*

A sample of the atmosphere was taken twice a week from each of the chambers with an electrostatic precipitator (Mines Safety Appliances). A few additional samples were taken as checks. The volume of air sampled during each test was 10 cubic feet in about 5 minutes.

Each sample taken was weighed to the nearest tenth of a milligram. For the sample containing silica plus NaCl aerosols, the precipitator tube was washed after being weighed and its NaCl content estimated by the classical Volhard method.

The quantity of silica in each chamber, although varying slightly from day to day, remained fairly constant on the whole. The average

for a series of 96 samples from each chamber during 183 days' exposure gives the following results :

Silica alone	47.8 mg. SiO_2
Silica plus 6 % aluminum	48.1 mg. $\text{SiO}_2 + \text{Al}$
Silica plus NaCl aerosols	42.6 mg. SiO_2 and circa 70 mg. NaCl ⁽¹⁾ .

It will be noted that the quantity of dust found in the chamber where silica and aerosols were dispersed simultaneously, is slightly lower than that of the other chambers. Since approximately the same quantity of silica entered each of the chambers (as can be seen from Table I

TABLE I
Dust Economy of the Exposure Method

Chamber	Dust Dispersed Gm	Dust Retained in Elutriator Gm	Dust Retained in Water Flask Gm	Dust Entering Chamber (by difference) Gm	Average Relative Humidity %
Silica alone	338	256 (75.6%)	71 (21%)	11.7 (3.4%)	
Silica + 6 % Aluminum	335	246 (73.6%)	73 (21.8%)	15.6 (4.6%)	62
Silica + NaCl Aerosols	351	256 (73%)	82 (23%)	14.1 (4.0%)	66
Outside air (attic)					61

which gives the average results for 15 experiments), it is reasonable to explain this slight difference by the fact that dust particles aggregated by the aerosols settle down more rapidly than individual particles, thus reducing to some degree the quantity of silica present at the level of the sampling (midway between floor and ceiling).

In order to estimate the particle size of the silica used, the following technique was employed : with the animals removed from the chambers, dry collector plates were placed on the floor of each chamber, the dust was dispersed for half an hour by the same procedure as that followed each day. After this half-hour dispersion, the dust was allowed to settle for 16 hours, after which the plates were withdrawn and examined under optical and electron microscopes (after shadowing with chromium

⁽¹⁾ The amount of NaCl in the air of the chamber containing silica + NaCl aerosol, as mentioned in the previous section, was greater at the end of the daily 6-hour exposure on account of the increase in concentration of the generating solution from 5 to about 10 %.

in the latter method). Aggregates included, the mean size of the silica dust was found to be 0.7 micron under electron microscope. Under optical microscope at 1125 X, the mean size for particles considered as discrete was 0.64 micron. Three per cent only were above 1.0 micron



FIG. 5

Appearance under electron microscope of dust coated with NaCl aerosols. Note debris of NaCl droplets with central crystal and adhering dust particles.

and none above 1.5 microns. Fig. 5 shows the appearance of the dust coated with NaCl aerosols. Debris of the NaCl droplets can be seen, with a NaCl crystal in the center adhering to dust particles.

III. — Pathology

This study had a dual purpose: 1. To determine whether or not the retention of dust was decreased in the presence of NaCl aerosols in repeated exposures; 2. To determine the action of both NaCl

aerosols and aluminum powder in the prevention or retardation of silicosis. The results relative to the second part of this work will be published later.

The number of animals serving only for the demonstration in this paper of the action of NaCl aerosols on the penetration of dust into the lungs was much reduced, in order to save as many animals as possible for observation of the effects of NaCl aerosols and aluminum powder upon the appearance of silicosis later. From each of the three chambers containing silica (silica alone, silica plus aluminum, silica plus NaCl aerosols) one rabbit was sacrificed after exposures of varying durations, 21 rabbits altogether.

24 days actual exposure spread over a period of 40 days							
50	"	"	"	"	"	"	75 "
74	"	"	"	"	"	"	109 "
103	"	"	"	"	"	"	149 "
122	"	"	"	"	"	"	177 "
145	"	"	"	"	"	"	212 "
183	"	"	"	"	"	"	266 "

The animals were sacrificed by intravenous injection of nembutal from 24 to 74 days and by a blow on the neck from 103 to 183 days. After tracheal ligation to prevent pulmonary collapse, the lungs were removed intact, injected through the trachea (below the ligature) with 12 cc. formalin, allowing the trapped air to escape through a pinhole, then fixed in 10 % formalin for 48 hours. The formalin was buffered to pH 7 with dibasic sodium phosphate and dihydrogen potassium phosphate, and had a salt concentration of approximately 0.9 %.

Tissue blocks extending from the hilus to the pleura were taken from corresponding parts of each lobe in each rabbit (right superior lobe, right middle, right inferior lateral, right inferior median, the left inferior and left superior lobes, and a large section of the left superior lobe, to correspond with the right middle lobe in man). After routine embedding in paraffin, sections were cut at a thickness of 6 microns for staining. One section from each lobe was stained with eosin methylene blue and one section stained for iron using PERLS' Prussian blue reaction (6), and counterstained with basic fuchsin.

Two other sections (cut at 15 microns) of each corresponding lobe were incinerated at 500° C. for two hours, one of them being then treated with 50 % HCl at 75° C. for two minutes and rinsed with distilled water (7). On such incinerated slides the estimation of the amount and distribution of dust in the lungs was readily accomplished by microscopic examination.

However, so as to avoid any subjective errors of interpretation, microphotographs were taken of sections from each rabbit at very low magnification (27 X) covering in all cases corresponding parts of the subpleural regions where, as it is known (8, 2), the dust tends to accumulate preferentially.

Furthermore, silica analyses were done on the left lung of each of these rabbits. The results are in table II.

Determination of Silica.

The method employed for silica determination was essentially that of KING (9), although a few modifications were made for the sake of simplicity and speed. The technique is described briefly as follows:

A representative sample of formalin-fixed lung tissue was dried to constant weight at 105°-110° C., pulverized in a nickel crucible with an iron pestle, and a 25 gm. sample weighed into a platinum dish. The sample was then carefully heated over a low flame to char the tissue after which a 25 gm. of sodium carbonate was added. Ashing was completed over a strong flame (> 1000° C.) which fused the sodium carbonate and effected the conversion of any silica present to soluble sodium silicate. The melt was dissolved in water, and made slightly acid with sulfuric acid and heated to dispel carbon dioxide. The solution was transferred to a 50 ml. flask and diluted to the mark with distilled water. An aliquot containing from 0.02 to 40 mg. of SiO_2 was transferred to a 50 ml. glass stoppered cylinder and diluted to about 40 ml. with water. 5 ml. of 5 % ammonium molybdate in 1 normal H_2SO_4 was added and the solution was mixed and allowed to stand 5 minutes for maximum color development. 3 ml. of 5 % oxalic acid was then added to bleach out any color due to the presence of phosphates. This technique, suggested by FEIGL (10), was chosen in preference to the phosphate precipitation method used by KING, because of its simplicity and the fact that comparative analyses in this laboratory gave equally good results with the two methods.

The solution was diluted to the mark, mixed and the density measured within a few minutes in a Coleman Spectrophotometer (Model 11) at a wave length of 420 millimicrons. The silica content of the sample was then read from a curve which was prepared by treating known amounts of silica in the manner described above.

Numerous analyses of known amounts of silica by the above method showed an accuracy equal to that reported by KING.

The reduced molybdate color method, used by KING and many others in visual comparison apparatus, was found to be unnecessary

since in the spectrophotometer the yellow silico molybdic acid method proved to be equally sensitive and reproducible.

TABLE II (1)

Weight of SiO₂ Found in the Lungs of Rabbits Exposed to the Three Different Test Conditions
(Each figure represents results from one rabbit)

	I	II	III
	SiO ₂	SiO ₂ + Al	SiO ₂ + NaCl
24 days' exposure	10.8 mg/gm. dry lung	3.9	7.3
50 " "	21.7 " " "	6.7	7.3
74 " "	4.1 " " "	14.0	13.3
103 " "	20.0 " " "	16.4	10.0
122 " "	24.5 " " "	19.0	10.2
145 " "	12.9 " " "	12.2	7.7
183 " "	27.2 " " "	32.3	9.3

A comparison of Columns I and III in table II reveals a reduction in the amount of silica retained in the lungs of these rabbits receiving their dust mixed with NaCl aerosol. However, regardless of this fact, we do not consider these results to be of significance in this type of experiment. The lung tissues analyzed included all of the lung, from just distal to the bifurcation of the trachea to the lung periphery. However, the effect of the NaCl aerosol upon the deposition of silica in the lungs, as will be shown below, is to increase the percentage of this dust impinging upon and settling into the walls of the bronchi, thereby increasing the ratio of bronchial to alveolar deposition of dust. It is, therefore, obvious that the silica analyses of the whole lung do not necessarily correspond to the amount of dust retained in the deep parts of the lungs. The significance of the above analytical results is subject to other variables, viz. differences in the body size, degree of thoracic expansion, uniformity of distribution of the inspired air and its velocity, differences in efficacy of ciliary action and nasal filtration.

DENNY, ROBSON and IRWIN (11) while finding some correlation between lung silica content and lung pathology, also observed the wide variation (up to 10 times) in analytical data obtained. See Table III.

(1) On normal adult rabbits (8 animals not exposed to SiO₂), the lung silica content was found to be 1.48 mg/gr. dry tissue.

TABLE III

Lack of parallelism between time of exposure to silica dust and the amount of silica found in the lungs

Data of Present Paper

Denny, Robson & Irwin

Hrs. Exposure to 88,000 particles/cc.	Mg. SiO ₂ per gm. dry lung	Hrs. Exposure to 20,000 particles/cc.	Mg. SiO ₂ per gm. dry lung
144	10.8		
300	21.7	1260	5.8
		"	55.0
444	4.1	1608	2.3
		1656	6.6
		"	14.2
		"	8.1
618	20.0	2316	34.0
		2412	43.2
		2580	87.4
		2628	8.9
732	24.5	2760	15.7
		2796	73.7
		"	46.5
		"	71.4
870	12.9	"	67.0
		"	51.3
		3024	9.7
1098	27.3		

Moreover, due to the absence of X-ray diffraction figures for the free silica present in the lungs, it cannot be assumed that the amount of silica found by chemical analysis represents the true picture of the actually active silica. It is therefore felt that, although these analyses may contribute to an evaluation of other data, they have little significance in themselves.

RESULTS

1) From exposures of 50 days on, the lung parenchyma of rabbits not submitted to NaCl aerosols shows dense foci dust-laden cells. The alveolar phagocytes are aggregated more closely and appear denser in SiO₂ + Al than in SiO₂ animals. In animals exposed to SiO₂ + Al,



FIG 6

Appearance of a large bronchus of a rabbit exposed to silica (containing 2 % iron) for 103 days.





FIG. 7

Appearance of a large bronchus of a rabbit exposed to silica (containing 2 % iron) + NaCl aerosols for 103 days. — Compare the iron blue stained bronchial epithelium to the corresponding bronchus of figure 6.



the aluminum is demonstrable in phagocytes by aurine staining⁽¹⁾ (I I, II) both diffusely and as discrete particles. The Prussian blue reaction from the admixed iron in silica dust is much more conspicuous in the large bronchi and much less in the alveoli in rabbits submitted to NaCl aerosols than in rabbits exposed to SiO_2 alone or $\text{SiO}_2 + \text{Al}$; in these latter cases, the alveolar dust foci appear deeply blue stained. In the large bronchi of aerosol-treated rabbits, the blue reaction appears either diffuse in the bronchial epithelial cells or as isolated particles admixed with mucus along the bronchial walls.

Figs. 6 and 7 show the appearance of a large bronchus after 103 days' exposure respectively to silica alone and to silica plus NaCl aerosol. As may be seen, the bronchial epithelium of the rabbit submitted to silica and NaCl aerosols is deeply blue-stained in a diffuse manner. Isolated particles are also seen admixed with bronchial mucus. The corresponding bronchus of the same lobe in the rabbit submitted to silica alone is free from the Prussian blue reaction. This indicates that the amount of silica (containing 2 % iron) deposited in the large bronchi is greater when NaCl aerosols are used.

Fig. 8 shows, at higher magnification, a representative picture of the appearance of the dust-laden cells in the alveoli of corresponding sub-pleural parts of rabbits exposed for 103 days to silica alone, silica plus aluminum, and silica plus aerosols, respectively. These results correspond in each of the 7 lobes of each of the 7 series of rabbits⁽²⁾, but are progressively more pronounced from 50 days' exposure on P. From this it may be concluded that aerosol-treated dust tends to deposit in the large bronchi and has a decreased tendency to penetrate to the depths of the lungs.

In silica-aluminum treated lungs, the areas showing the aurine reaction correspond exactly to the areas stained with the Prussian blue reaction. The aurine reaction is always negative in lungs treated with silica alone and $\text{SiO}_2 + \text{NaCl}$ aerosol.

(1) A 2 % aurine solution buffered to an approximate pH 5.2 (the buffer solution being made up of 3.8 parts of 5 Molar Solution Ammonium Chloride, 3.8 parts of 5 Molar Solution Ammonium Acetate and 1 part of 6 Normal Solution Hydrochloric Acid) is prepared just before staining the sections. The aurine solution is heated to approximately 75° C. and then poured into the staining jar containing the sections and left at room temperature for 5 minutes. The sections then are rinsed in water, dipped 3 times in a decolorizing solution (same buffer solution as in aurine solution, 0.36 part, + ammonium carbonate 1.6 molar, 1 part), rinsed in water, counterstained with a weak solution of methylene blue (1 cc. of 1 % methylene blue solution + 125 cc. of 2 % acetic acid solution + 375 cc. distilled water), dehydrated (in 95 % alcohol 5 minutes, absolute alcohol 5 minutes, acetone-xylol 50/50 5 minutes, xylol 5 minutes) and mounted in clarite.

(2) Altogether 147 lung sections.



FIG. 8

A) Appearance of dust-laden cells in subpleural parts of a rabbit's lung after 103 days' exposure to silica alone. Note foci of alveolar dust cells. B) Appearance of dust-laden cells in subpleural parts of a rabbit's lung after 103 days' exposure to silica + aluminum. Note foci of alveolar dust-laden cells denser than in A. C) Appearance of subpleural alveoli of a rabbit's lung after 103 days' exposure to silica + NaCl aerosols. Note absence of dust foci.

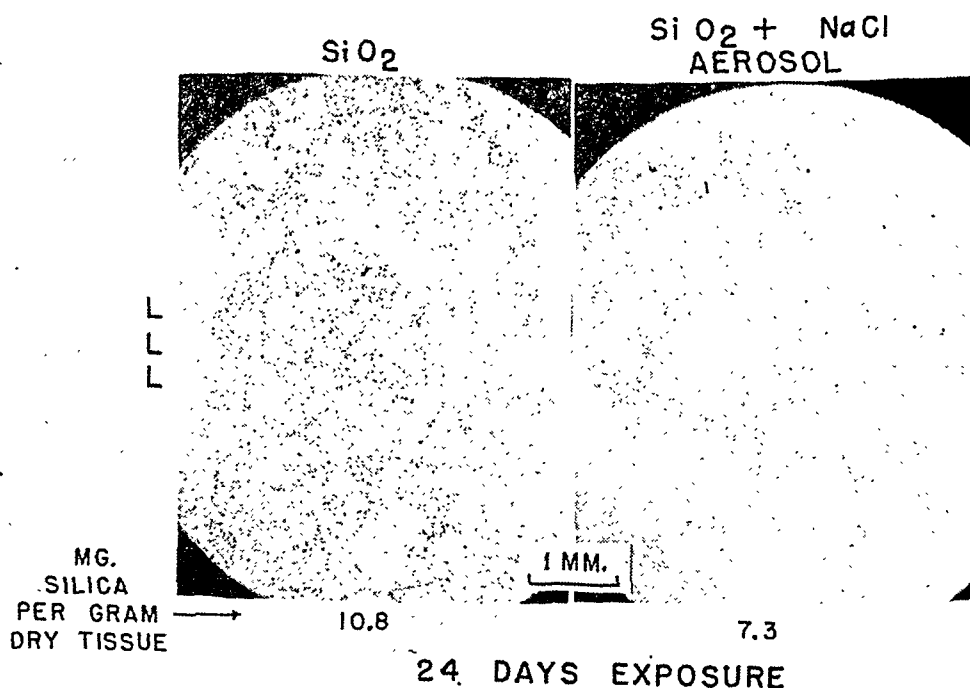


FIG. 9

Incinerated acid-treated subpleural sections of 2 rabbits' lungs after 24 days' exposure respectively to silica alone and silica + NaCl aerosols.

2) Examination of the incinerated sections confirms these findings. Fig. 9 (24 days' exposure), Fig. 10 (50 days' exposure), Fig. 11 (103 days' exposure, Fig. 12 (122 days' exposure) and Fig. 13 (145 days' exposure) at low magnification (27 x) show that even in the subpleural parts, the amount of dust retained in the lungs is much smaller when NaCl

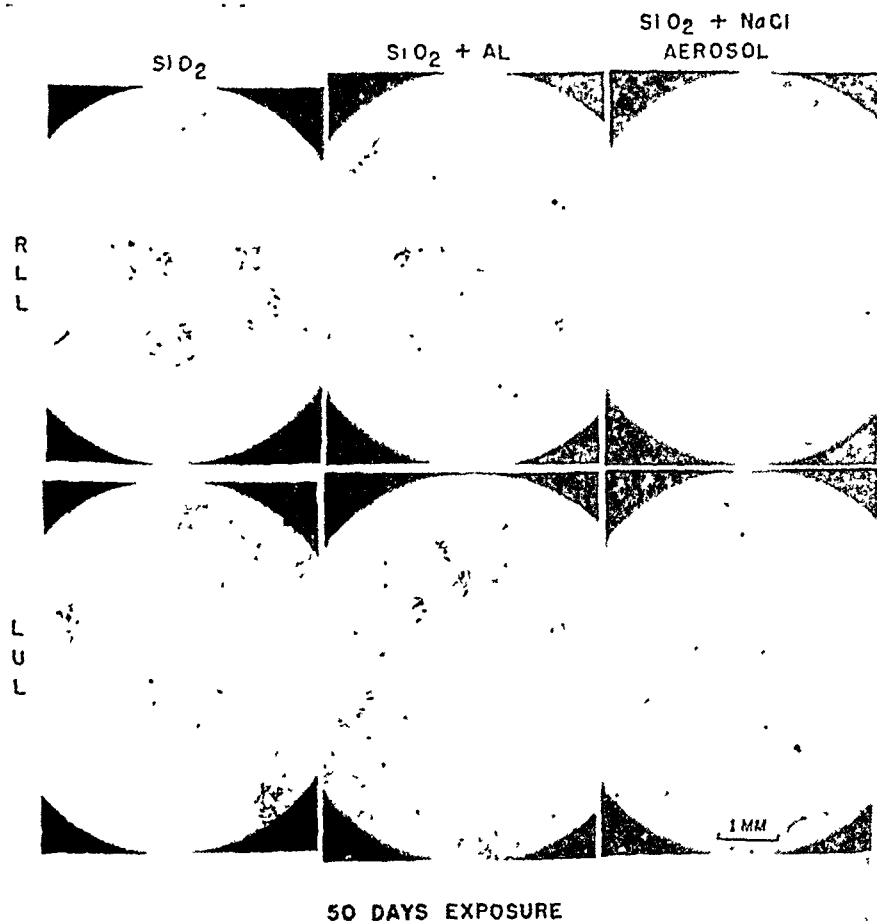


FIG. 10

Incinerated acid-treated subpleural sections of 3 rabbits' lungs after 50 days' exposure respectively to silica alone, silica + aluminum and silica + NaCl aerosols.

aerosols are used. From these photomicrographs it can also be seen that the accumulation of dust in foci, which is common when silica alone or silica plus aluminum is used, is hardly ever encountered when dust is aerosol-treated.

Fig. 14 shows the gross appearance of rabbit's lungs after 183 days' exposure respectively to silica alone, silica + aluminum and silica + NaCl aerosols. It also shows the aspect of a rabbit's lung exposed for 94 days to ± 70 mg. per cubic meter of NaCl in aerosol form.

Macroscopic lesions can be seen in rabbit exposed to silica alone (note, also, presence of pulmonary abscess) and to silica + aluminum. They appear as spots of various dimensions, definitely smaller but more numerous in the silica-aluminum rabbit. The lungs of the rabbit exposed to silica + NaCl aerosols showed no macroscopic lesions as

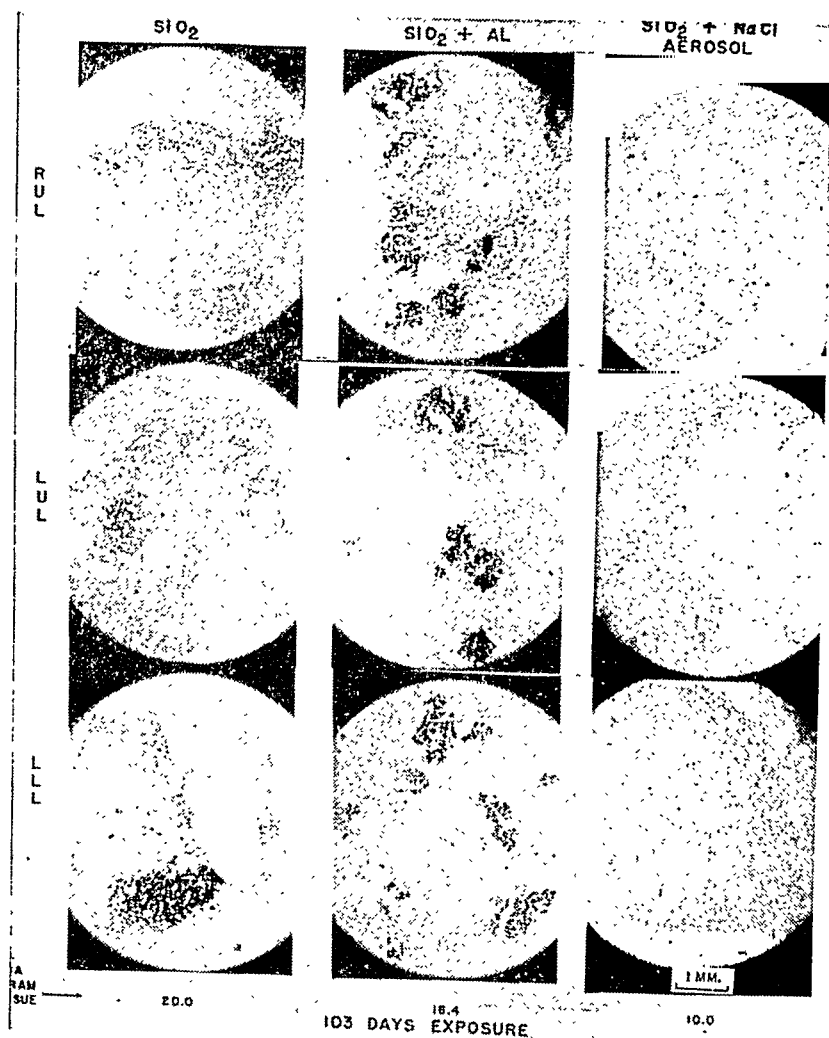


FIG. 11

Incinerated acid-treated subpleural sections of 3 rabbits' lungs after 103 days' exposure respectively to silica alone, silica + aluminum and silica + NaCl aerosols.

borne out by the sections of this tissue (FIG. 15). Microscopic sections of these lungs (Prussian blue stain) at very low magnification (2, 4 x) show the overall distribution of dust foci in silica-alone and silica + aluminum rabbits as well as the complete absence of foci in silica-aerosol treated rabbits (FIG. 15).

Fig. 16 shows the appearance of incinerated acid-treated sections (in corresponding subpleural regions) at 27 x and confirms previous findings as evidenced by figs. 9, 10, 11, 12 and 13.

After 183 days' exposure, the lymphatic glands at the root of the lungs are practically free of dust in silica + aerosol rabbit, while they

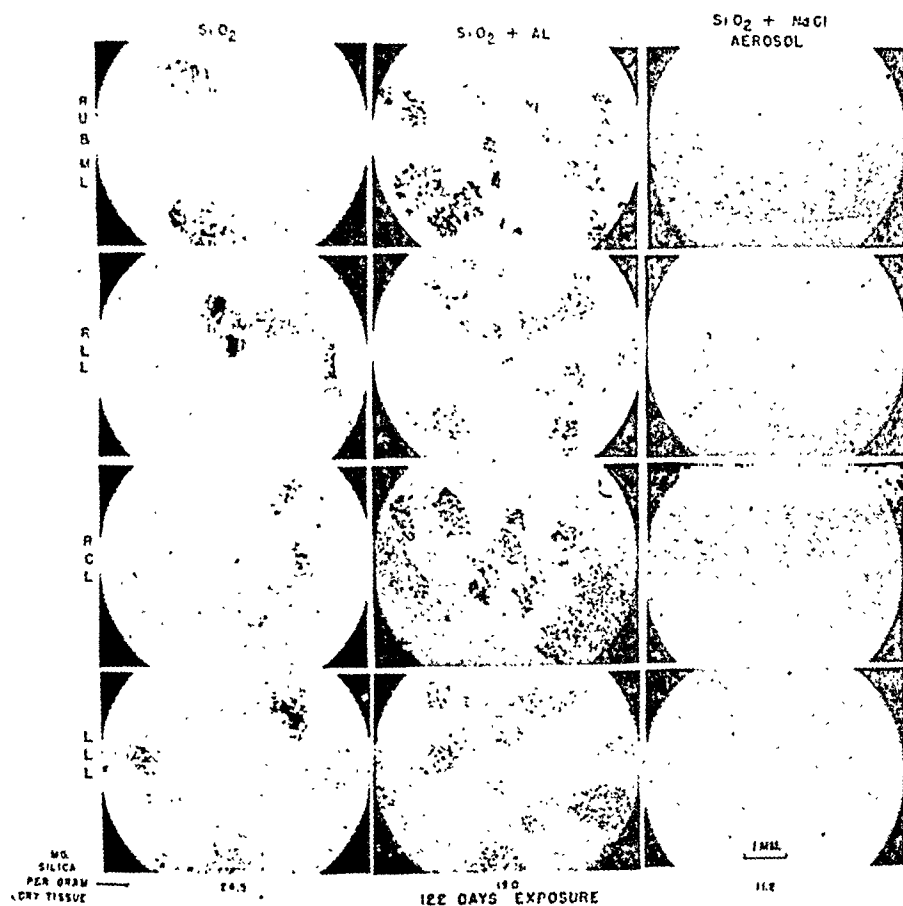


FIG. 12

Incinerated acid-treated subpleural sections of 3 rabbits' lungs after 122 days' exposure respectively to silica alone, silica + aluminum and silica + NaCl aerosols.

appear to contain dust (either scattered or in foci) in silica alone and silica + aluminum rabbits either in stained sections (Prussian blue reaction) or in incinerated acid-treated sections (FIG. 17).

Study of the two sets of incinerated sections (acid and non-acid-treated) also permits the localization of the iron accompanying the silica. On ordinary incinerated slides examined under oblique illumination, the characteristic color of iron oxide appears as a coating on the large bronchi in the aerosol-silica rabbits while in silica-alone rabbits or in silica-aluminum rabbits, the large bronchi are free of the

iron color, although the smaller bronchi sometimes show it. In the two latter cases, the alveoli and the dust foci in the pulmonary depths are iron stained. The iron color, in all cases, disappears in acid-

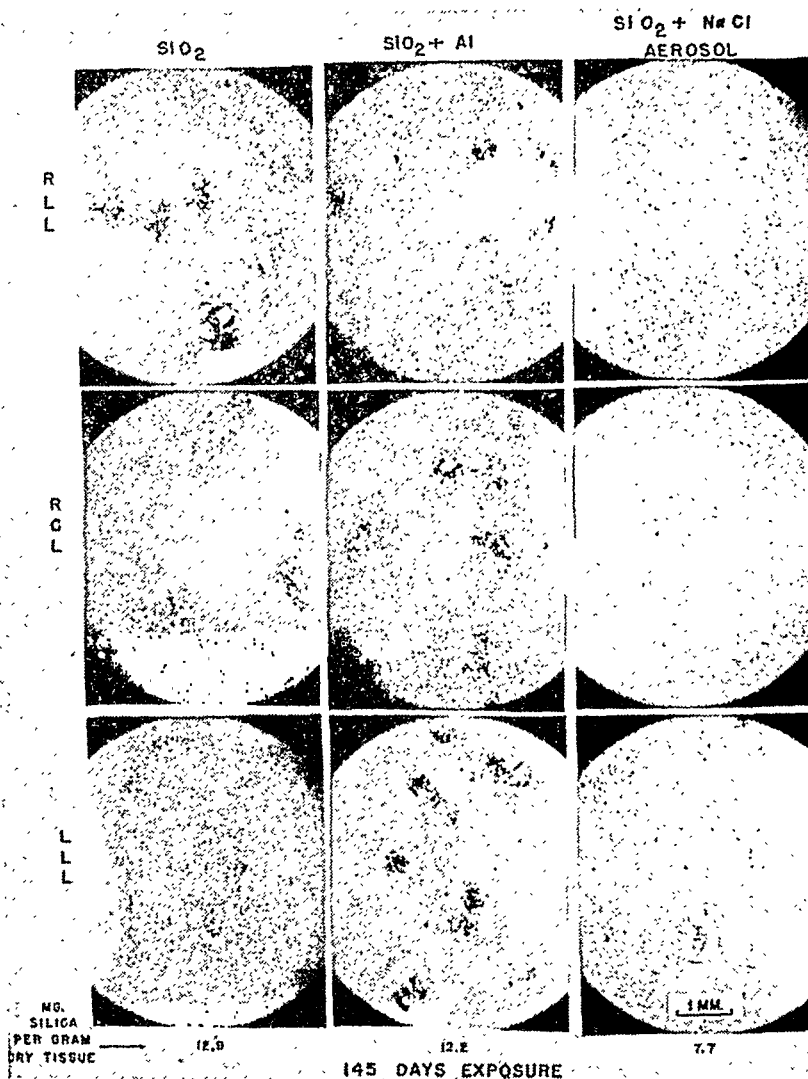


FIG. 13

Incinerated acid-treated subpleural sections of 3 rabbits' lungs after 145 days' exposure respectively to silica alone, silica + aluminum and silica + NaCl aerosols.

From fig. 11 to fig. 13 note absence of dust foci in alveoli when treated with NaCl aerosols. Note, also, that aluminum-silica dust foci are denser and more numerous than silica alone dust foci.

treated incinerated sections. The localization of the iron color observed in non-acid-treated incinerated sections corresponds exactly to the localization of the Prussian blue reaction observed in the stained sections. This indicates that iron mixed with silica in 2 % proportion is a con-

RABBIT LUNGS

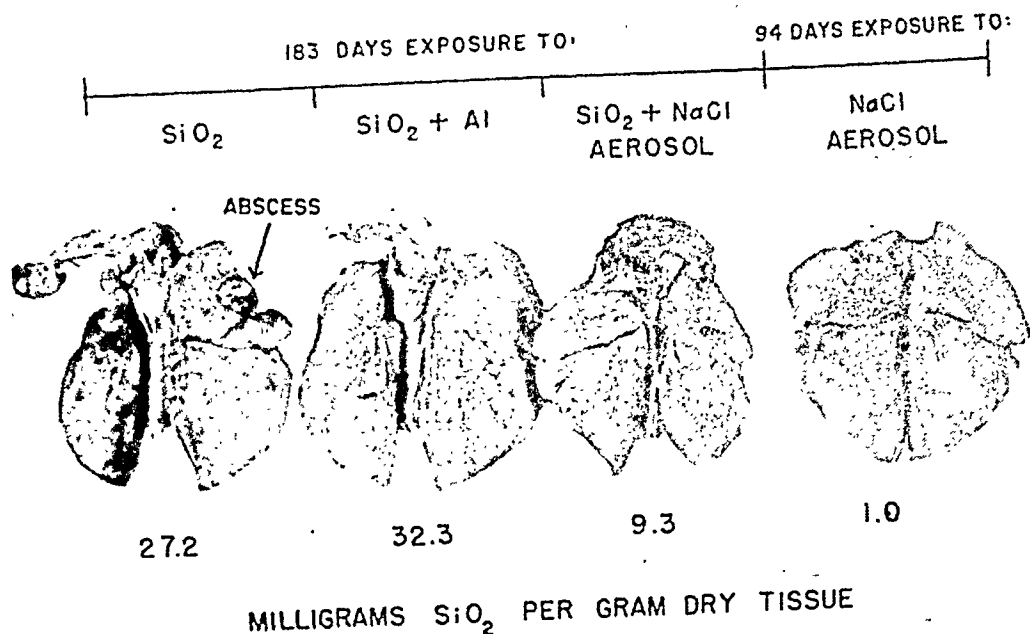


FIG. 14

Gross appearance of rabbit's lungs after 183 days' exposure respectively to silica alone, silica + aluminum and silica + NaCl aerosols. Note macroscopic lesions in silica alone and silica + aluminum rabbits.

Appearance of rabbit's lung after 94 days' exposure to NaCl aerosols alone (circa 70 mg. NaCl per cubic meter of air).

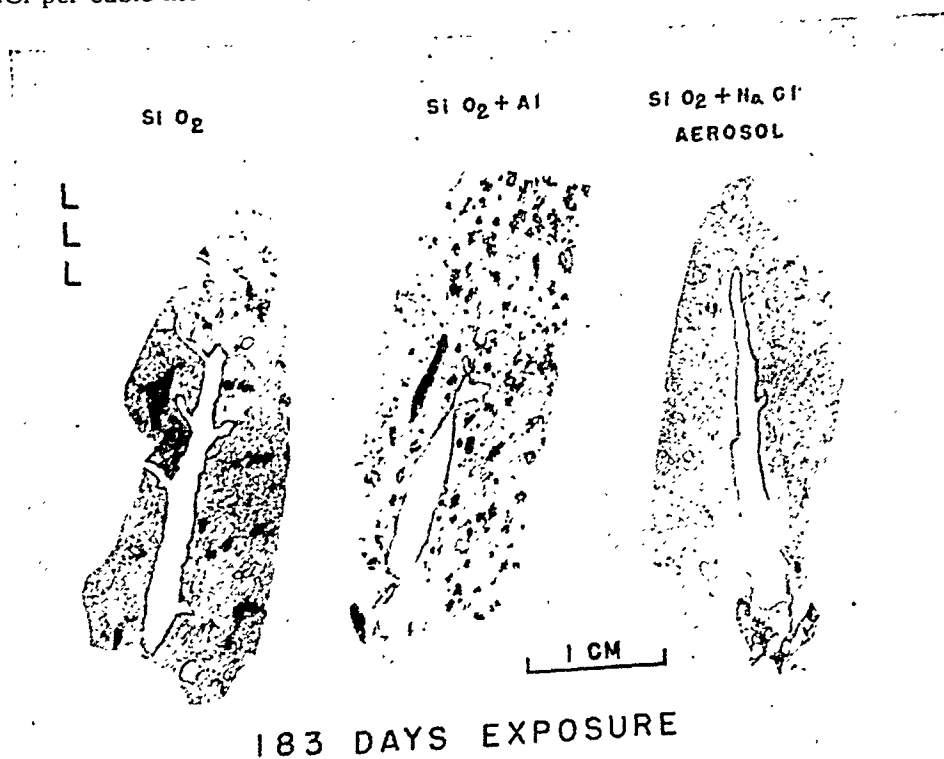


FIG. 15

Overall distribution of dust in rabbit's lungs after 183 days' exposure to silica alone, silica + aluminum and silica + NaCl aerosols. Note absence of important dust foci in NaCl aerosol-treated rabbit. Perls' Prussian reaction with basic Fuchsin counter-stain.

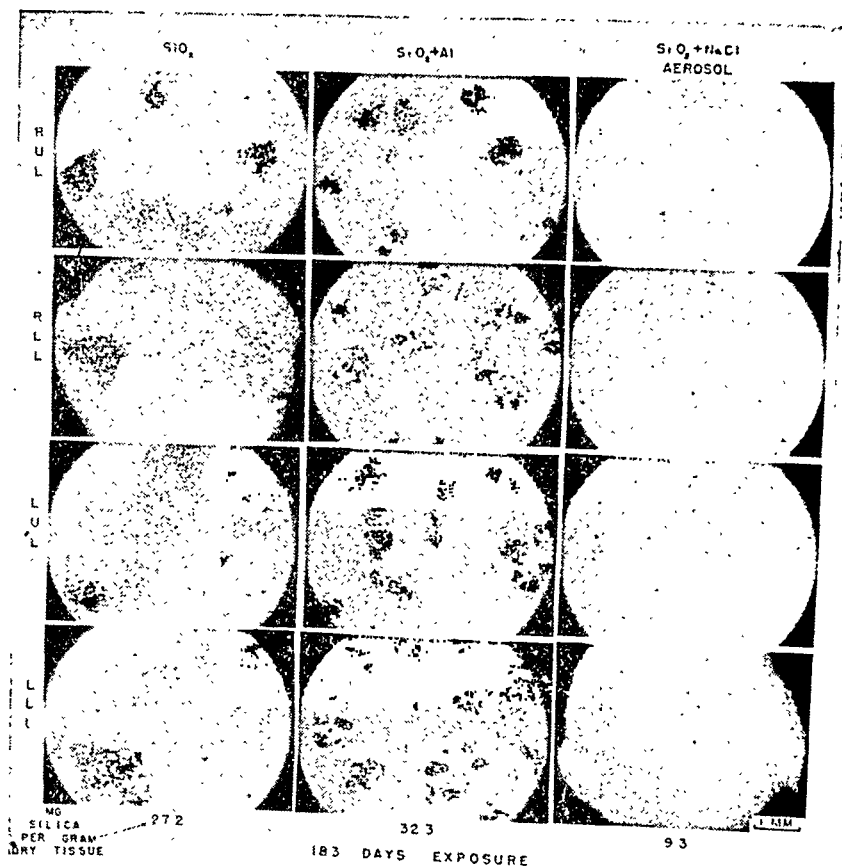


FIG. 16

Incinerated acid-treated subpleural sections of 3 rabbits' lungs after 183 days' exposure respectively to silica alone, silica + aluminum and silica + NaCl aerosols. Note absence of dust foci in NaCl aerosol-treated rabbit.

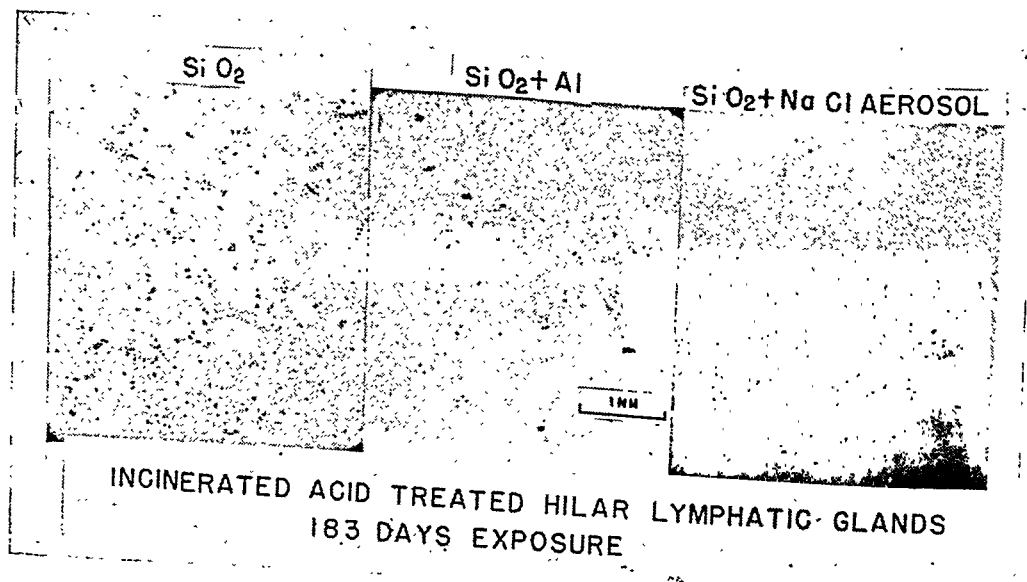


FIG. 17

Incinerated acid-treated lung lymphatic glands of 3 rabbits after 183 days' exposure respectively to silica alone, silica + aluminum and silica + NaCl aerosols.

venient means of tracing the latter in stained as well as in incinerated sections.

3) Some fragmentary results reported in a previous paper (2) indicated that NaCl aerosols did not, by themselves, produce any significant change in the histological appearance of rabbits' lungs after short exposures to such aerosols. Another series of rabbits and rats has been exposed to NaCl aerosols (± 70 mg. per cubic meter) for longer periods of time and the lungs compared with those of 5 normal rabbits and 10 normal rats, according to the following schedule :

Nos. Rabbits	Nos. Rats	Time of Exposure
5	5	5 hours
5	5	10 hours (in 2 days)
1		13 days (6 hrs. a day)
1	1	34 days (6 hrs. a day)
1	1	53 days (6 hrs. a day)
1		60 days (6 hrs. a day)
1	1	94 days (6 hrs. a day)
1		113 days in 2 periods of 60 and 53 days, interrupted by 2 months in normal atmosphere.

All the rabbits gained in weight during long exposures and none has shown histological changes which can be attributed to the NaCl aerosols.

Blood chloride estimations have been made in normal rabbits and in rabbits chronically exposed to silica dust alone, to silica plus aluminum, to silica plus NaCl aerosols, to aluminum powder alone and to NaCl aerosols alone. The results are reported in the following table :

TABLE IV
Blood Chlorides (Mg %) — Rabbits (1)

Type Exposure)	5 hrs.	10 hrs.	34 da.	50 da.	54 da.	74 da.	91 da.	103 da.	121 da.	130 da.	145 da.	183 da.
Controls	449 (4)										498 (8)	
5% NaCl	429 (4)	473 (4)	493 (1)		522 (1)	492 (6)	547 (1)					
5% NaCl + SiO ₂						390 (1)		448 (1)	454 (1)	536 (1)	518 (1)	547 (1)
Alumin.					493 (1)	519 (1)	503 (4)					
Alumin. + SiO ₂				402 (1)		401 (1)		470 (1)	486 (1)	519 (1)	514 (1)	528 (1)
SiO ₂						358 (1)		464 (1)	432 (1)	584 (1)	531 (1)	544 (1)

(1) The numbers in parenthesis refer to the number of animals in each experiment.

From these results it can be assumed that NaCl aerosols, by themselves, do not produce any apparent effects. The general trend of the blood chlorides to increase with length of exposure, even in those animals not subjected to NaCl aerosols, cannot be satisfactorily explained, except possibly on a seasonal basis, the exposure covering an eight month's period from the middle of December to the middle of August.

4) Three groups of four young rabbits (weighing ca. 2 kilos) were exposed respectively to silica dust, silica and aluminum dust and silica + NaCl aerosols. After 5 months of exposure the weights of all rabbits became approximately constant. The group exposed to silica dust and saline aerosols, however, had gained ca. 500 grams over the others, and this difference was maintained up to 8 months, when the present study ended.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Evidence has been presented to confirm our previously expressed opinion that prolonged inhalation of aerosols generated from a 5 % to 10 % sodium chloride solution produces no harmful effects in rabbits and rats. The results obtained during 24 to 183 days' exposure on 7 rabbits compared to 7 rabbits exposed to silica alone and 7 rabbits exposed to SiO_2 + aluminum show that the mixture of such aerosols with air containing a high concentration of quartz dust has lessened the amount of dust deposited in the lungs. In addition to this favorable quantitative comparison, histological examination of lung sections has shown that the aerosol treated silica dust which does penetrate the lung does not tend to accumulate in large alveolar dust foci as is the case with untreated dust or silica mixed with aluminum. It thus appears that the distribution of the aerosol treated dust in the lung would be less conducive to the development of silicosis than in the case of untreated dust. Exposures are being continued in an effort to confirm this thesis.

The use in aerosol form of a cheap, readily absorbable and excretable agent and one normally found in the body fluids, such as sodium chloride, appears to offer advantages over previous methods used for combatting fine dusts, provided, of course, final results are equal or superior to previously used methods. This will require confirmation in the field.

ACKNOWLEDGMENTS

We are greatly indebted to Dr. RALPH W. G. WYCKOFF, of this Laboratory, for his invaluable cooperation in making electron microscope pictures of many dust and aerosol samples. Grateful acknowledgment is also due to Mr. R. D. REED of the photographic laboratory for the large number of photographs made for us in the course of this work, to Messrs. J. B. FLOYD and WILLIAM L. CONWAY who faithfully performed the many duties connected with the exposure work and to Miss DOROTHY HASTINGS, of this Laboratory, for the X-ray analysis of dust samples. We also express our deepest appreciation for assistance in textual editing to Dr. H. SPECHT of this Laboratory.

BIBLIOGRAPHY

1. — DAUTREBANDE, L., HIGHMAN, B., ALFORD, W. C. and THOMPSON, E. C. Studies on Aerosols I. Reduction of dust deposition in lungs of rabbits by aqueous aerosols., *Journ. Ind. Hygiene*, 1948, 30, 103.
2. — DAUTREBANDE, L., HIGHMAN, B., ALFORD, W. C., WEAVER, F. L. and THOMPSON, E. C. Studies on Aerosols IV. Reduction of dust deposition in lungs of rabbits by saline aerosols., *Occupational Medicine*, 5, 506-521, 1948.
3. — U. S. Bureau of Mines. Health and Miscellaneous Hazards in Metal Mines., *Miner's Circular*, 1946, No. 57, p. 10.
4. — SCHRENK, H. H. Testing and design of respiratory protective devices. U. S. Bureau of Mines, *Information Circular* 7086, September 1939.
5. — DAUTREBANDE, L., HIGHMAN, B., ALFORD, W. C. and WEAVER, F. L. Studies on Aerosols III. Production of liquid aerosols with an average mean micellary diameter under one-half micron. Study of the agglutination of liquid micellae., *Archiv. Internat. Pharmacod.*, 1948, 76, 247.
6. — PERLS, H. *Virchow's Arch. f. Path. Anat.*, 1867, 39, 42.
7. — IRWIN, D. A. The histological demonstration of siliceous material by microincineration, *The Canadian Medical Association Journal*, 1934, 31, 135, 31, 140.
8. — SIMSON, F. W. and STRACHAN, A. S. Silicosis and Tuberculosis. Observations on the origin and character of silicotic lesions as shown in cases occurring on the Witwatersrand, *Publication of the South African Institute for Medical Research*, 1935, 6, 367.

9. — KING, E. J. The estimation of silica in tissues, *Journ. Biol. Chem.*, 1928, 80, 25.
KING, E. J. and STANTIAL, H. Microdetermination of Silica. *Biochem. Journ.*, 1933, 27, 1007.
10. — FEIGL, F. Z. *Anal. Chem.*, 1929, 77, 299.
11. — DENNY, J. J., ROBSON, W. D. and IRWIN, D. A. The prevention of silicosis by metallic aluminum I. A preliminary report, *The Canadian Medical Association Journ.*, 1937, 37, 1. The prevention of silicosis by metallic aluminum II, *The Canadian Medical Association Journ.*, 1939, 40, 213.

LABORATORY OF PHYSICAL BIOLOGY. EXPERIMENTAL BIOLOGY AND
MEDICINE INSTITUTE. NATIONAL CANCER INSTITUTE. NATIONAL INSTI-
TUTES OF HEALTH. BETHESDA 14, MARYLAND

STUDIES ON AEROSOLS

VII. Dust aggregation with NaCl aerosols. Differentiation under the electron microscope of SiO_2 dust particles and NaCl crystals

BY

L. DAUTREBANDE, H. KAHLER, B. J. LLOYD
AND E. R. MITCHELL

(Received for publication 20-4-1949).

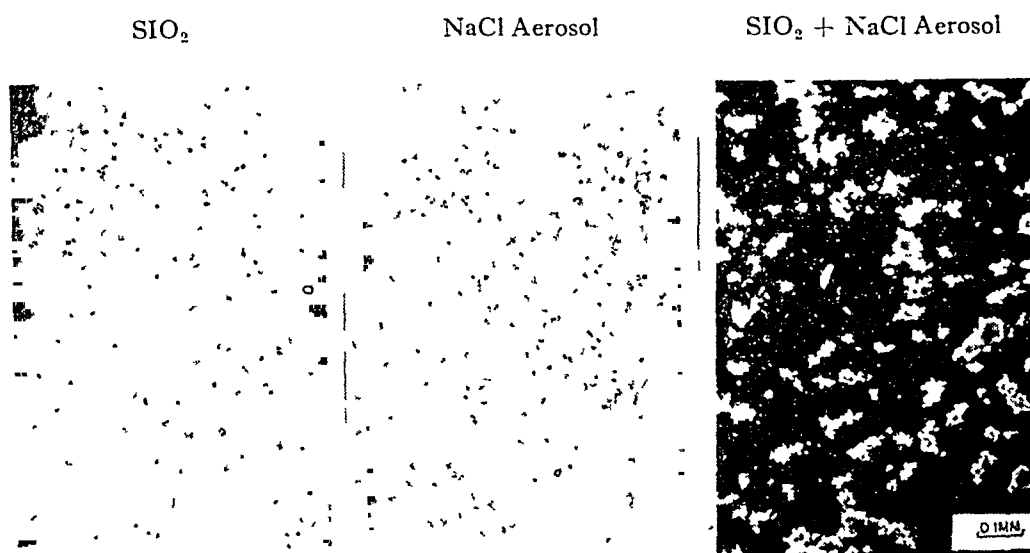
It has been shown previously (1) that NaCl aerosols (micellary mean size : 0.5 micron under the optical microscope), when mixed in the air with fine dust particles produced a liquid coating on the particles as well as their aggregation, resulting in an increase in size, a greater retention of the dust in the upper parts of the respiratory tract and consequently a reduction of the dust deposition in the deep parts of the lungs (1, 2).

It has also been shown that the more concentrated the aerosol-generating solution, the larger were the aggregates formed. With a 5 to 10 % solution, the mean size of the aggregates was found to be ca 7 microns for 0.5 micron dust particles (mean size), some of the aggregates having been observed up to 30 microns (1). These results were obtained with an optical microscope at $1125 \times$ magnification, after passing dust alone and the dust-aerosol mixture through a chamber where the particles were collected by sedimentation on a glass slide.

The present paper deals with ultra and electron microscopic findings, using for the dust collection either sedimentation or electrostatic precipitation.

For electrostatic precipitation, a Mine Safety Appliances device was used. Samples of the various atmospheres were collected at midway

between ceiling and floor in different chambers where, under the same conditions, dust alone, NaCl aerosols alone and dust + aerosols were dispersed according to a method described elsewhere (2). For the dark field ultramicroscopic pictures, samples were collected on large glass coverslips (24×50 mm.) inserted at the distal end of the cylindrical collecting tube and the pictures taken in each case at the center of the coverslip. Figure 1 represents, at low magnification, the appearance



Electrostatic precipitator samples
+ Cu Ft air / two minutes lateral illumination

FIG. 1

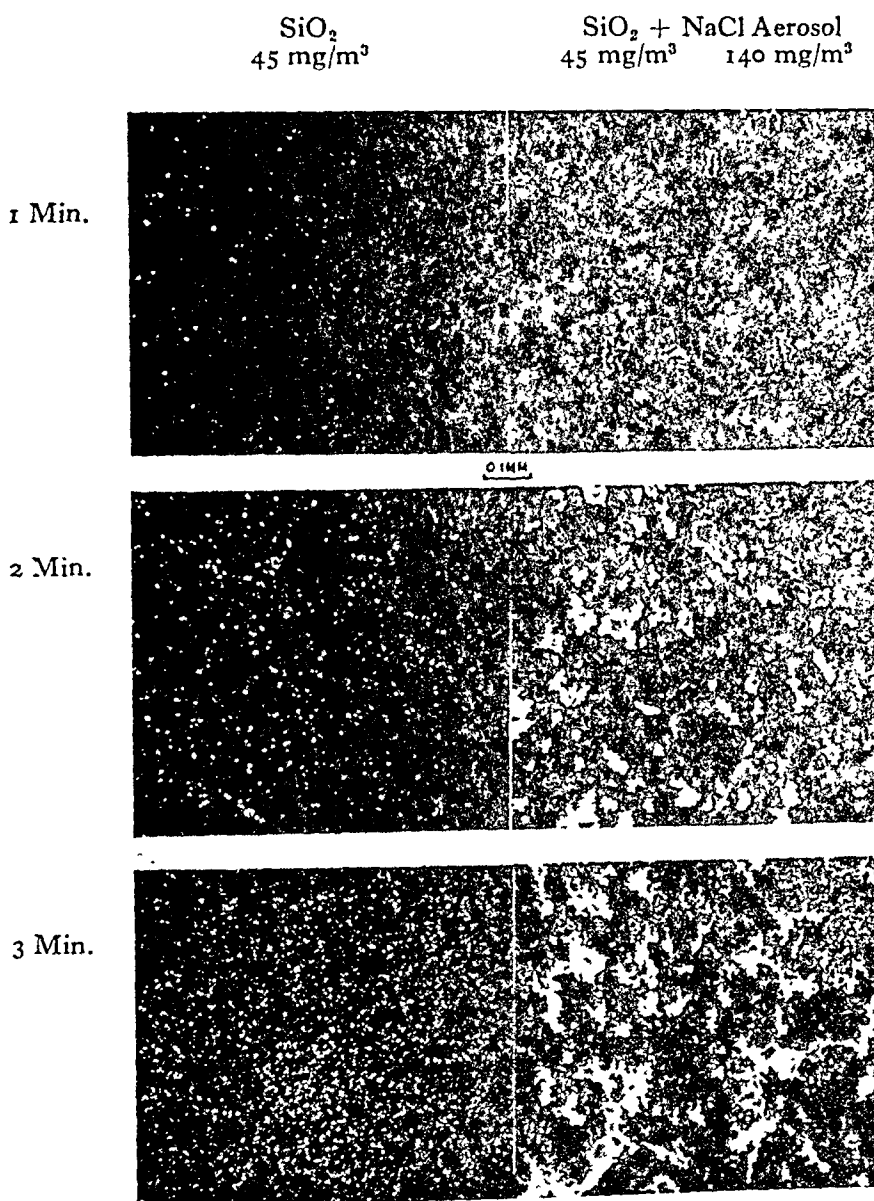
Formation of large aggregates by mixing SiO_2 dust with NaCl aerosol.

respectively of dust alone, NaCl aerosol alone and dust-aerosol samples for a 2-minute collection. Figure 2 shows that, in the collections of 1, 2, and 3 minutes' duration in identical positions in the collecting tube, the aggregation process increases as the duration of collection is lengthened.

For electron microscopic studies, seven collodion screens were placed on an aluminium plate (1×8 centimeters) placed at the distal end of the collecting tube. This method allows one to study increasing concentrations of deposits from proximal to distal collodion screens (compare 1st row Fig. 6 to 2nd row Fig. 3).

Figure 3 shows the appearance respectively of SiO_2 dust alone, NaCl aerosols and dust with aerosol samples taken from the 7th (most distal) collodion screen. As can be seen from this figure, the mixture of SiO_2 dust and NaCl aerosols results in a considerable aggregation.

However, in such a picture, the differentiation of the dust particles within the aggregates did not appear feasible and therefore a procedure was attempted for reaching such a differentiation. After shadowing



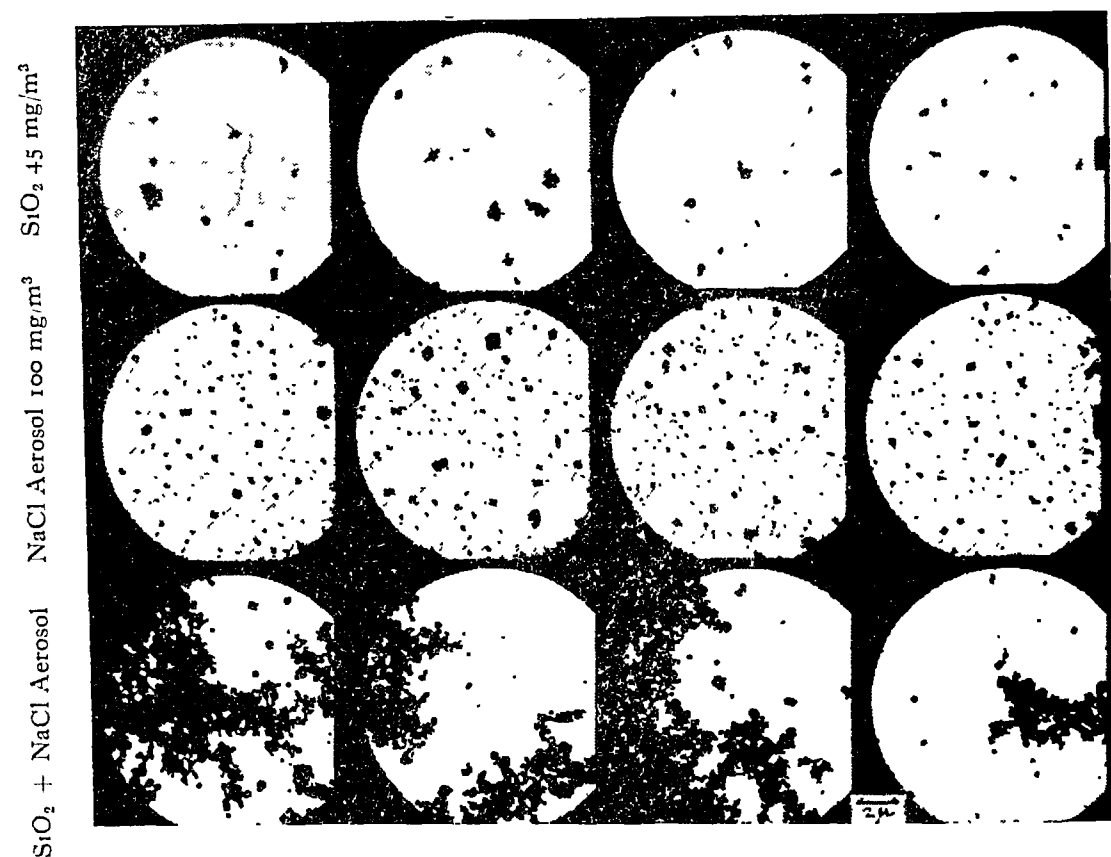
Electrostatic precipitator samples
2 Cu. Ft/Minute lateral illumination

FIG. 2

Progressive increase in number and size of dust-aerosol aggregates with increased periods of collection.

with chromium, a picture of the aggregates was taken, then the aggregates were submitted to an electron bombardment, using the biased filament gun, care being taken not to disrupt the collodion substratum. Under a powerful electron beam, one can follow very easily the pro-

gressive clearing up of the NaCl crystals due probably to their evaporation, while the SiO_2 dust particles, having a higher evaporation temperature, remain stable under the beam. The result is shown in figures 4 and 5, representative of a dust-aerosol aggregate before (FIG. 4)



Electrostatic precipitator samples
2 Cu. Ft/Minute, 2 Minutes electron microscope.

FIG. 3

Appearance under the electron microscope of SiO_2 dust, NaCl aerosol and SiO_2 -NaCl aerosol mixture.

and after (FIG. 5) heating the sample. These figures clearly show that the proposed differentiation of the two kinds of particles can easily be obtained by the technique described.

Figure 6 is the representation of samples from the first (most proximal) of the seven collodion screens. It can be seen that mixing aerosol with dust increases the amount of NaCl crystals collected. The clearing up of the NaCl crystals is also shown at the lower part of the

picture (1). Figure 7 refers to different samples of SiO_2 dust alone and dust + NaCl aerosol collected by overnight sedimentation on collodion screens placed at the bottom of the exposure chambers and chromium shadowed. The NaCl crystals appear cleared up by the electron

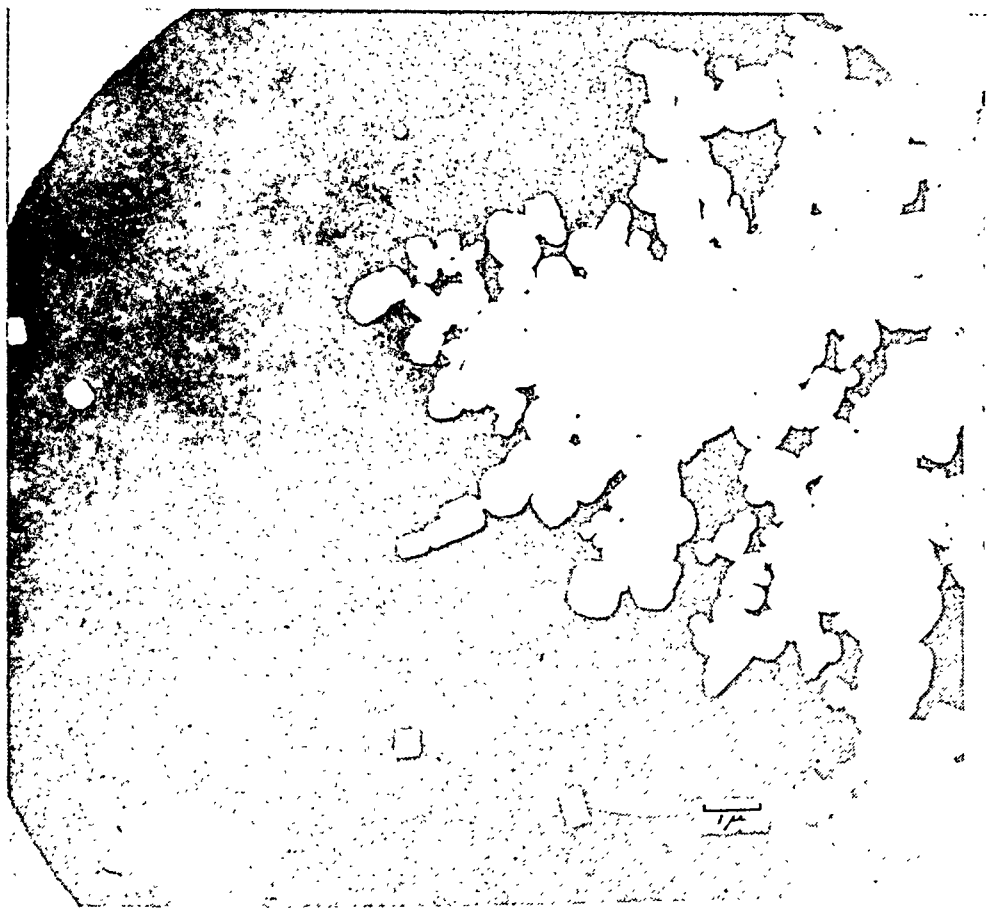


FIG. 4

SiO_2 dust and NaCl aerosol aggregate before bombardment with an intense electron microscope beam.

bombardment. Here again the differentiation of the NaCl crystals and the dust particles is readily recognized. The amount of SiO_2 dust dispersed was 64 milligrams per cubic meter of air (upper picture of FIGURE 7); for the dust-aerosol mixture (lower picture of FIGURE 7), the amounts of material dispersed were respectively 50 mg/m^3 SiO_2 and 128 mg/m^3 NaCl aerosol. From these pictures it can also be seen that mixing SiO_2 dust with NaCl aerosol not only produces large aggregates but also that the amount of dust collected per field is much greater when the dust is mixed with NaCl aerosols.

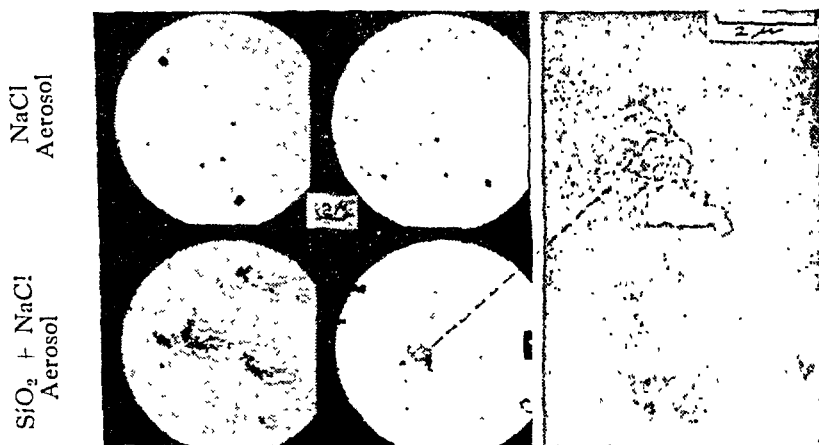
(1) In fig. 5 and 6 sufficient electron heating deliberately was not given to evaporate all the NaCl crystals.



FIG. 5

Same aggregate as in fig. 4 after bombardment with an intense electron microscope beam. The NaCl crystals are now easily differentiated from the SiO_2 dust particles.

Electron microscope



Electrostatic precipitator
2 Cu. Ft/Min.-2 Min.

FIG. 6

Upper row : NaCl aerosol. Lower row : NaCl aerosol + SiO_2 dust after clearing up of some of the NaCl crystals. On the enlarged view of a SiO_2 -aerosol aggregate, the intact silica dust particle and the residual chromium shells on the NaCl crystals are visible.

16 hour sedimentation.

Electron microscope.



Note the larger amount of dust collected with aerosol.

FIG. 7

Aggregation of SiO_2 dust by NaCl aerosol (overnight sedimentation). Differentiation of dust particles from NaCl crystals.

SUMMARY

Confirmation is obtained that NaCl aerosols induce aggregation of fine SiO_2 dust particles. A method is described for the differentiation of SiO_2 dust particles and NaCl crystals within the aggregates, utilizing an intense electron microscope beam.

REFERENCES

1. — L. DAUTREBANDE, B. HIGHMAN, W. C. ALFORD, F. L. WEAVER and E. C. THOMPSON. Effect of saline aerosols on dust in atmosphere. Reduction of dust deposition in lungs by saline aerosols. *Occupational Medicine*, 1948, 5, 506.
2. — L. DAUTREBANDE, W. C. ALFORD, D. A. IRWIN, E. R. MITCHELL, E. C. THOMPSON, F. L. WEAVER and E. J. WOOD. Effect of aluminum powder and of NaCl aerosols upon the pulmonary deposition of silica dust (long exposure). *Archives intern. Pharmacod.* 1949, 80, 388.

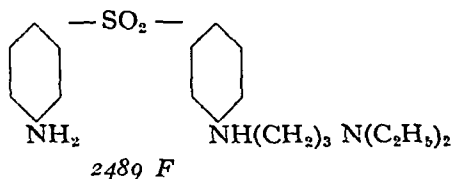
SERVICE DE CHIMIE THÉRAPEUTIQUE, INSTITUT PASTEUR — PARIS

PROPRIÉTÉS CARDIOTOXIQUES DU 2489 F
(4 - AMINO - 4' - DIÉTHYLAMINOPROPYLAMINO - DIPHÉNYLSULFONE)
ACTION ANTAGONISTE DU 1262 F (DACORÈNE)
(With Summary)

PAR

J. JACOB, G. MONTÉZIN ET D. BOVET ⁽¹⁾*(Travail reçu le 22-3-1949).*

La 4-4'diamino-diphénylsulfone et plusieurs de ses dérivés sont principalement connus pour leurs propriétés antimicrobiennes; la 4-amino-4'-diéthylaminopropylamino-diphénylsulfone (2489 F), dont la synthèse a été réalisée par T.-J. TRÉFOUËL et N. HURION-BEAUGEARD, se singularise par d'intenses propriétés cardiotoxiques, déjà décrites par l'un de nous (BOVET, BOVET-NITTI, TRÉFOUËL et BEAUGEARD, 3).



Cette substance provoque, chez le chien, des symptômes apparentés à ceux qu'occasionnent des doses toxiques de corps digitaliques ou d'aconitine et la mort survient le plus souvent par fibrillation ventriculaire; en outre, ces troubles cardiaques peuvent être remarquablement prévenus par l'administration d'un autre dérivé de synthèse, le 1262 F ou 2-diéthylaminoéthylamino-diphényle.

Ces faits nous ont incités à poursuivre l'étude de l'intoxication par le 2489 F. — Dans ce travail nous exposerons les résultats d'expériences qui ont eu pour objet :

- 1) une description précise de la symptomatologie de l'intoxication aiguë chez le chien;
- 2) les modifications que subissent ces symptômes sous l'influence de poisons du système nerveux autonome et d'agents pharmacologiques auxquels des propriétés antifibrillantes ont été attribuées.

⁽¹⁾ Adresse actuelle : Istituto Superiore di Sanità, Roma.

I

CARACTÈRES DE L'INTOXICATION CARDIAQUE PAR LE 2489 F

Chez le chien, les symptômes sont presque exclusivement cardiaques et l'absence d'action extracardiaque importante apparaît tout aussi bien chez l'animal éveillé que chez l'animal anesthésié.

1. — *Essais sur le chien normal*

L'administration, par voie sous-cutanée de 10 mg/kg de 2489 F provoque la mort du chien normal en 1/2 heure à 3/4 d'heure. Pendant ce laps de temps, la respiration, la motricité et la psychisme de l'animal sont normaux; les sécrétions lacrymales et salivaires, le diamètre pupillaire restent inchangés et il ne survient ni vomissement, ni diarrhée. Le rythme cardiaque est régulier, mais la fréquence en est augmentée. L'électrocardiogramme révèle déjà des anomalies importantes. Puis, brutalement, sans autre symptôme prémonitoire, l'animal s'abat comme une masse; les battements cardiaques deviennent rapidement imperceptibles. L'animal, gisant, respire encore pendant une minute environ; quelques mouvements respiratoires profonds indiquent son agonie; l'ECG traduit alors un état fibrillatoire des ventricules.

Parfois la fibrillation ne se produit pas et l'animal peut échapper à cette première crise. En quelques instants il semble redevenu normal mais une seconde crise peut encore survenir et se terminer par la fibrillation ventriculaire mortelle.

Si la dose administrée est moindre (5 mg/kg), l'animal se comporte tout à fait normalement et rien ne traduirait l'intoxication, n'étaient une tachycardie modérée et les déformations du tracé électrocardiographique.

2. — *Essais sur le chien anesthésié*

Chez le chien anesthésié à la chloralosane, l'intoxication par le 2489 F évolue en quatre stades :

le premier, inconstant, correspond à des phénomènes cardiotoniques;

le second est caractérisé par des anomalies des systoles cardiaques qui restent parfaitement régulières. On ne peut déceler ces troubles qu'au moyen d'enregistrements qui permettent l'analyse de chaque systole (ECG ⁽¹⁾, tracés mécaniques à grande vitesse); nous l'avons

(¹) Les tracés électriques ont été recueillis en dérivation II au moyen de l'électrocardiographie à inscription directe de Duchosal-Luthi.

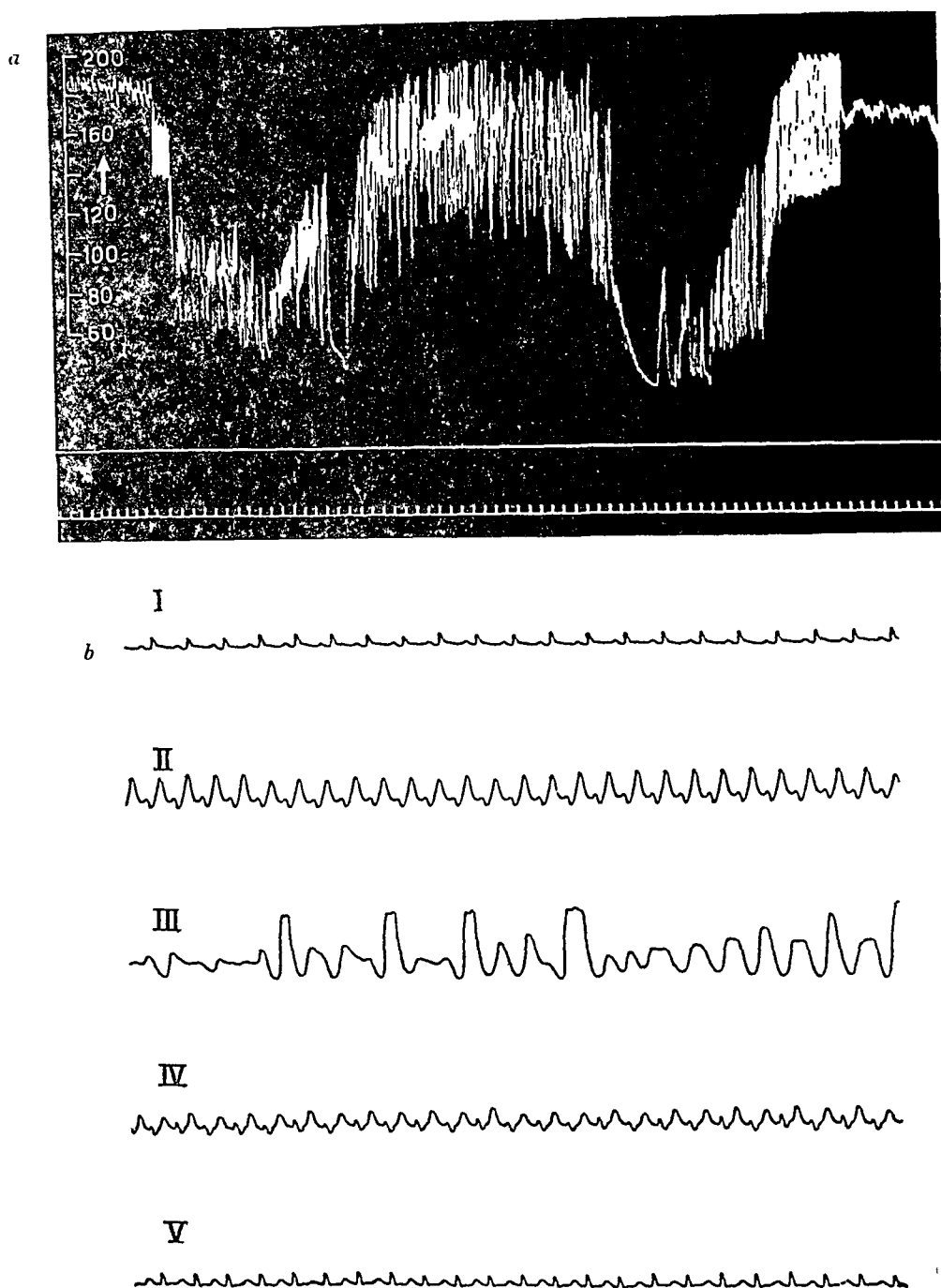


FIG. 1
Intoxication par le 2489 F

Expérience du 15-1-48. — Chien ♂ 7 kg, anesthésié à la chloralose.

En haut : Tracé tensionnel.

Temps en 10 secondes.

En ↑ injection i.v. de 2489 F (1,5 mg/kg).

Aspect typique de la bradysphygmie anarchique; celle ci apparaît 50 sec. après l'injection et rétrocede spontanément.

En bas : Electrocardiogrammes.

I. Tracé témoin.

II. 30 sec. après l'injection : Tachycardie, disparition de P et de l'intervalle S T; Prédominance de S; Onde T considérable.

III. Tracé anarchique : complexes arrondis, inégaux et irréguliers.

IV. 5 minutes après la rétrocession de l'anarchie.

V. 15 minutes plus tard.

dénommé : « stade de l'intoxication larvée » (FIG. 1; ECG II et IV); le troisième se manifeste par l'irrégularité et l'inégalité extrêmes des contractions cardiaques; il s'agit d'une « anarchie ventriculaire » ⁽¹⁾ (FIG. 1, ECG. III).

Enfin le dernier stade correspond le plus souvent à la fibrillation ventriculaire, parfois au simple arrêt diastolique du myocarde.

a) Effets cardiotoniques.

Inconstants et médiocres, ils se traduisent par l'accroissement :

- de l'amplitude des contractions auriculaires et ventriculaires.
- du tonus du myocarde (FIG. 2).
- des déflexions de l'E.C.G.

La fréquence cardiaque est parfois accrue de façon modérée et la pression artérielle s'élève légèrement (1-2 cm Hg).

b) Stade de l'intoxication larvée.

A ce stade la pression artérielle est généralement encore supérieure à la normale. Le rythme cardiaque est régulier, sa fréquence est augmentée, parfois de façon considérable. Les mécanogrammes enregistrés à faibles vitesses montrent une légère diminution de l'amplitude des contractions auriculaires et ventriculaires; la cardiométrie indique une légère diminution du volume systolique et du tonus ventriculaire (FIG. 2).

A la période d'état, toutes les systoles sont mécaniquement et électriquement identiques entre elles, elles se succèdent à des intervalles rigoureusement égaux mais leur tracé individuel est profondément anormal. Ces modifications ne peuvent pas être décelées pour la contraction auriculaire.

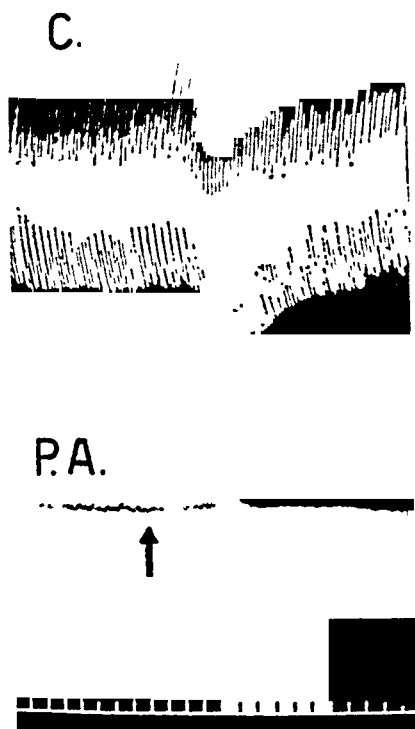


FIG. 2

Action du 2489 F sur le volume du cœur

Expérience du 23-2-48. — Chien ♀ 9 kg, anesthésié à la chloralose.

C : Tracé cardiométrique (méthode de Henderson). L'augmentation du tonus systolique s'inscrit vers le bas.

PA : Pression artérielle.

Temps en 10 secondes.

En ↑ injection i.v. de 2489 F (0,5 mg/kg).

On observe une augmentation transitoire puis une dépression du tonus systolique. Le volume systolique diminue légèrement. La pression artérielle est peu affectée.

⁽¹⁾ L'expression est empruntée à A. CLERC (29).

Les anomalies de la systole ventriculaire sont :

— d'une part, le dédoublement de l'onde en plateau du tracé mécanique (FIG. 3) qui prend un aspect analogue à celui des systoles fractionnées de DE BOER (14);

— d'autre part, des altérations électriques comportant (FIG. 1)

l'élargissement du complexe ventriculaire initial dont la composante S s'est approfondie et élargie (l'onde R est le plus souvent déprimée);

l'accroissement considérable de l'onde T (ou d'une onde qui occupe l'emplacement de T) et l'abolition de l'intervalle S T.

Ce tracé très particulier a été réalisé par des modifications progressives de l'E.C.G. normal. — L'intervalle P R s'est allongé et l'onde P a, finalement, fusionné avec l'onde T. — La volume de cette dernière s'est accru progressivement et l'apport de l'onde P ne peut rendre compte, à lui seul, de cet accroissement. — L'intervalle S T, après une phase, inconstante, d'électronégativité, a disparu en raison du développement considérable de T.

Ces images électrocardiographiques évoquent, tantôt une tachycardie sinusale (fusion de P et de T), tantôt une tachycardie ventriculaire. Elles traduisent aussi des troubles de la conduction auriculoventricu-

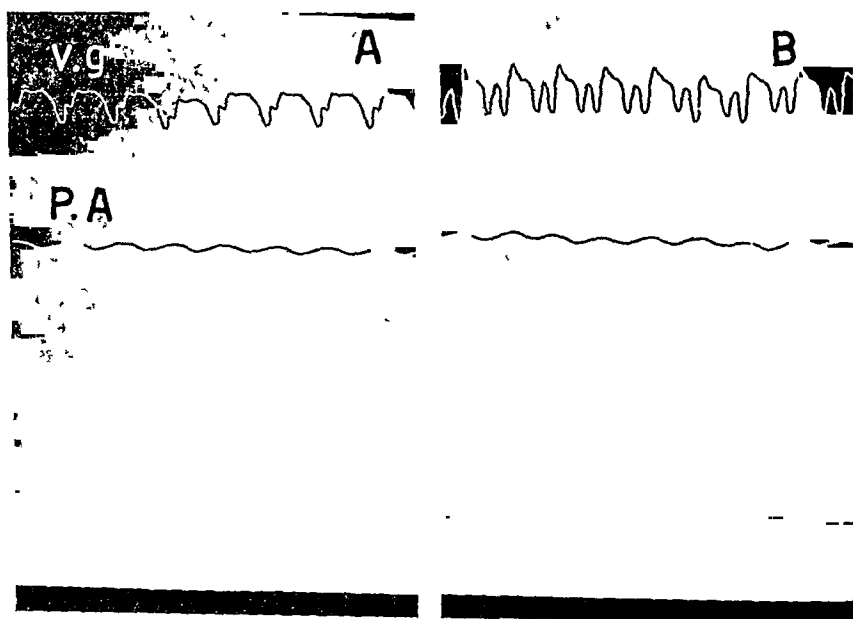


FIG. 3
*Action du 2489 F sur la contraction ventriculaire
Deuxième stade*

Expérience du 10-2-48. — Chien ♂ 8 kg, anesthésié à la chloralose.

V.G. : Mécanogramme ventriculaire gauche (méthode du cœur suspendu).

P.A. : Pression artérielle.

Vitesse de rotation du cylindre : environ 1 mètre/minute.

En A : Mécanogramme normal.

Entre A et B : administration i.v. de 2489 F (1 mg/kg).

En B : Les systoles sont régulières et égales mais le tracé de chacune d'elles s'est dédoublé : la P.A. est légèrement augmentée.

laire (allongement de P R) et de la conduction intraventriculaire elle-même (élargissement du complexe ventriculaire initial) et présentent des analogies avec les tracés théoriques de retard du dextrogramme (LUTEMBACH, 29) ainsi qu'avec les courbes obtenues par HOFF et NAHUM (23), BYER, TOTH et ASHMAN (7) à la suite de modifications locales de température des ventricules.

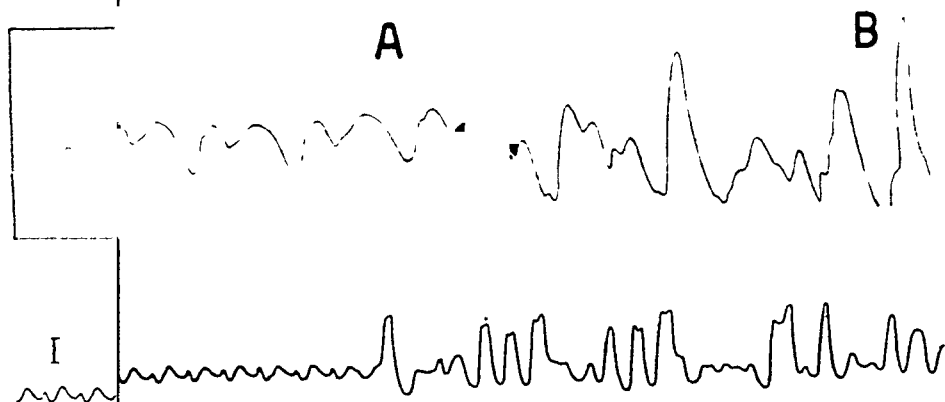


FIG. 4

Début de l'anarchie par le 2489 F

En haut : Mécrocardiogrammes du ventricule gauche.
 En bas : Electrocardiogramme.
 Expérience du 9-2-48. — Chien ♀ 16 kg, anesthésié à la chloralose.
 Vitesse de rotation du cylindre : environ 2 mètres/minute.
 En A : Mécrocardiogrammes normaux.
 Entre A et B : première administration i.v. de 2489 F (1 mg/kg).
 En B : La première systole a un aspect « fractionné ». Une extrasystole introduit ensuite l'anarchie.

En bas : Electrocardiogramme.
 Expérience du 16-12-48. — Chien ♂ 17 kg, anesthésié à la chloralose.
 L'animal a reçu 1,25 mg/kg de 2489 F.
 Les tracés : normaux, mais réguliers, du deuxième stade font place, brutalement, à celle-ci débute par une extrasystole de type ventriculaire.
 L'anarchie.

c) Stade de l'anarchie ventriculaire.

L'anarchie ventriculaire succède brutalement au stade précédent; elle débute par une extrasystole hétérotope (FIG. 4). La pression artérielle peut rester assez élevée; assez souvent, elle s'effondre brutalement; dans les deux cas, le tracé en est tout à fait irrégulier, constitué par des oscillations en majorité très amples. Dans l'ensemble, le rythme paraît lent (FIG. 1).

Si l'on enregistre in situ les contractions auriculaires et ventriculaires, on constate que, parfois, les premières restent égales et régulières mais que, toujours, les secondes sont absolument désordonnées (FIG. 5). Chacun des ventricules bat indépendamment de l'autre. Le rythme est essentiellement instable, alternativement lent, fréquent,

avec des lambeaux de tachycardie, des systoles en salves, et des arrêts de plusieurs secondes. Les systoles sont très inégales et la bradysphygmie enregistrée au manomètre à mercure traduit l'inefficacité d'un grand nombre d'entre elles.

L'enregistrement électrocardiographique montre une succession de

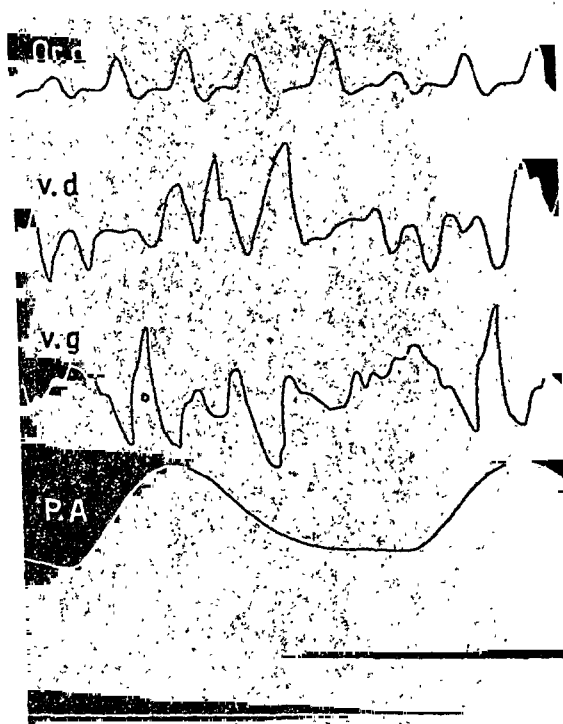


FIG. 5

Mécanogrammes auriculaires et ventriculaires. Phase d'anarchie
(Méthode du cœur suspendu)

Expérience du 9-2-48. — Chien ♀ 16 kg, anesthésié à la chloralose.

L'animal a reçu 1 mg/kg i.v. de 2489 F.

Or D. : mécanogramme auriculaire droit.

V. D. : mécanogramme ventriculaire droit.

V. G. : mécanogramme ventriculaire gauche.

P. A. : Pression artérielle.

Vitesse de rotation du cylindre : environ 2 mètres/minute.

Les contractions auriculaires sont inégales mais assez régulièrement espacées.

Les contractions ventriculaires sont désordonnées et il n'y a pas de correspondance entre celles du ventricule droit et celles du ventricule gauche.

La courbe de P.A. montre que, parmi ces contractions deux seulement sont efficaces.

complexe anormaux, inégaux et multiformes (FIG. 1 : E.C.G. III. FIG. 6 : E.C.G. II et III); certains de ces complexes sont encore constitués par les accidents classiques déformés et élargis; d'autres sont réduits à de larges oscillations arrondies; le tout est parsemé de blocks et de phases de flutter ventriculaire.

Il semble bien qu'il s'agisse là d'une anarchie ventriculaire, de cette

dislocation des fonctions rythmiques des ventricules qu'ont décrite CLERC et LÉVY (29). Elle traduit essentiellement des troubles graves de la conduction ventriculaire et l'existence de foyers d'excitation hétérotopes, surtout ventriculaires.

L'une des caractéristiques les plus curieuses de cette intoxication réside dans le fait que des tracés à ce point bouleversés sont compatibles avec la vie et même, souvent, réversibles.

d) *Stade terminal* (FIG. 6 : E.C.G. IV).

La mort survient le plus souvent par fibrillation des ventricules sans participation des oreillettes. Cet état fibrillatoire semble seulement constituer l'exagération du stade précédent avec une diminution de plus en plus grave de la force des contractions qui sont de plus en plus incoordonnées et parcourent les ventricules dans tous les sens.

Parfois ce stade fibrillatoire n'a pas été décelé. Dans tous les cas l'arrêt cardiaque s'effectue en diastole.

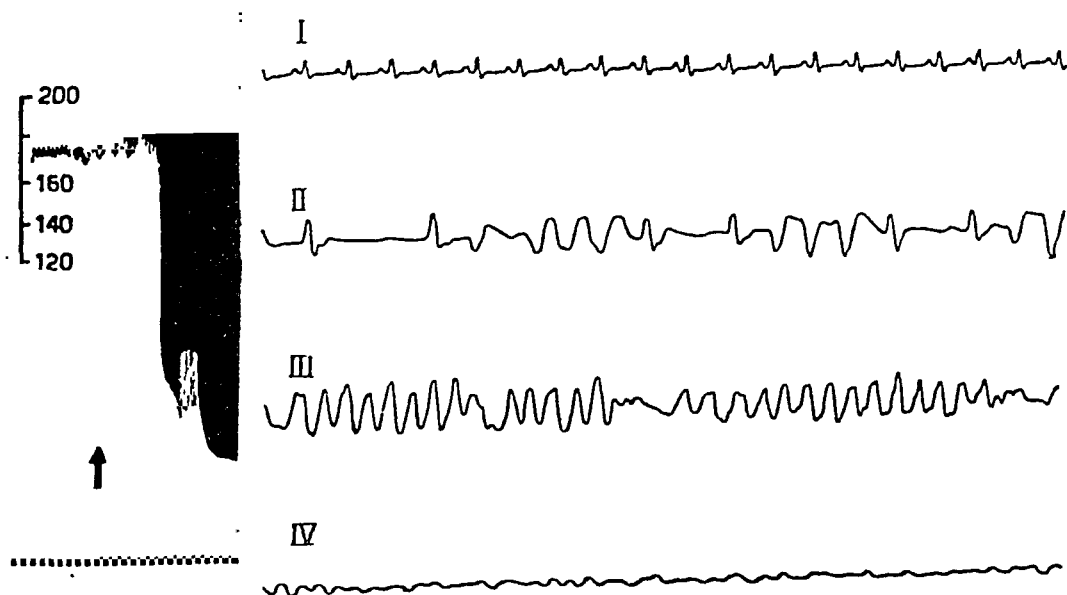


FIG. 6

Fibrillation ventriculaire par le 2489 F

Expérience du 24-11-48. — Chien ♂ 10 kg, anesthésié à la chloralose.

A gauche : Tracé tensionnel.

Temps en 10 secondes.

En ↑ : injection i.v. de 2489 F (1 mg/kg).

Latence de 50 secondes : brève anarchie; chute définitive de la pression.

A droite : Electrocardiogrammes :

I. Tracé témoin.

II. Aspect de l'anarchie : systoles étirées à configuration presque normale et images arrondies de forme variable.

III. Aspect de l'anarchie : images de flutter ventriculaire.

IV. Fibrillation (fréquence 330/min.)

Posologie.

Les effets toniques ont été parfois observés à l'état isolé, après injections intraveineuses de 0,1 à 0,5 mg/kg. Ils sont, alors, très transitoires (2 à 3 minutes). Si la dose administrée est plus élevée, ils sont moins durables encore et font rapidement place aux phénomènes déficitaires. La netteté de ces effets toniques varie d'un animal à l'autre.

L'administration de 0,5 mg/kg i.v. a toujours provoqué les déformations électrocardiographiques de l'intoxication larvée : ces déformations persistent pendant 10 minutes et plus, et rétrocedent spontanément. Si la dose a été plus élevée, ce stade est toujours réalisé mais sa durée ne dépasse pas une à deux minutes.

L'anarchie ventriculaire a été réalisée chaque fois qu'une dose convenable était injectée. Si cette dose est injectée en une fois, elle est en moyenne, pour 25 chiens, de 1,4 mg/kg [déviations standard de 0,5; doses extrêmes 0,75 et 2 mg/kg ⁽¹⁾]. Comme nous venons de le dire, une minute s'écoule en général entre le moment de l'injection et l'apparition des premières extrasystoles. Chez 21 animaux sur 25, cette anarchie a été spontanément réversible ; dans ces cas elle a persisté pendant 5 à 15 minutes et parfois davantage. Sa rétrocession est assez souvent annoncée par quelques groupes de systoles égales et régulières. Le tracé tensionnel redevient alors normal, à l'exception de quelques extrasystoles dispersées pendant les premières minutes, mais l'E.C.G. montre les déformations de l'intoxication larvée pendant les 15 à 30 minutes qui suivent la fin de l'anarchie (FIG. 1).

Chez la plupart de ces animaux nous avons pu provoquer l'anarchie à plusieurs reprises en administrant chaque fois des doses égales à celles utilisées pour la faire apparaître la première fois.

Action sur la respiration.

Pendant l'intoxication par le 2489 F aucune manifestation extra-cardiaque importante ne nous est apparue et nous nous bornerons à signaler que la respiration est peu modifiée; lorsque, finalement, la pression artérielle tombe à 0, l'animal respire encore quelques instants et de grands mouvements respiratoires agoniques montrent que le

(¹) Nous faisons ici abstraction d'un très jeune animal pour lequel nous avons dû recourir à 5 mg/kg. Ce cas fait penser à l'observation classique suivant laquelle de très jeunes animaux se montreraient parfois résistants à la faradisation des ventricules (HOOKER, 25).

centre et les muscles respiratoires ne sont pas paralysés. — Les injections intracarotidiennes de 2489 F ont provoqué, avec des doses plus élevées, les mêmes symptômes que les injections intraveineuses.

3. — *Susceptibilité de différentes espèces animales*

Nous venons de voir que, chez le chien, la mort survient le plus souvent par fibrillation ventriculaire, en l'absence de symptômes apparents d'atteinte du système nerveux central.

Il n'en est pas de même pour les autres espèces animales que nous avons étudiées.

Chez le lapin, le cobaye, la souris et le poulet, intoxiqués par voie intraveineuse, sous cutanée ou buccale, le 2489 F détermine certes des accidents cardiaques analogues à ceux que l'on observe chez le chien. La ressemblance est surtout nette dans le cas du cobaye pour lequel on retrouve les déformations électrocardiographiques typiques de l'intoxication larvée (approfondissement de S et accroissement de T) et ensuite une arythmie avec complexes électriques multifformes. Mais la mort par fibrillation ventriculaire est exceptionnelle. Les troubles observés témoignent en outre d'une atteinte du système nerveux central (ataxie, tremblement) et la mort survient dans un état de prostration extrême avec bradycardie intense ou à la suite de convulsions violentes. — Les doses toxiques chez ces animaux sont approximativement : lapin, 4 mg/kg i.v. — cobaye, 20 mg/kg i.v. — souris, 25 mg/kg i.v. — grenouille, 100 mg/kg s.c. — On connaît d'autres toxiques qui, selon l'espèce animale, provoquent la mort, tantôt par fibrillation cardiaque, tantôt par atteinte du système nerveux central : c'est, par exemple, le cas pour les fluoroacétates récemment étudiés par CHENOWETH et GILMAN (9, 10).

Il est assez probable que l'absence de symptômes nerveux chez le chien intoxiqué procède moins d'une résistance particulière du système nerveux central de cet animal au 2489 F que de la grande facilité avec laquelle son cœur fibrille.

Le cœur isolé de grenouille est peu influencé par le 2489 F. Nous n'avons jusqu'à présent observé aucun effet inotrope ou tonotrope positif. Les troubles rythmiques sont peu significatifs et nous n'avons pas obtenu de systoles fractionnées. Le cœur s'arrête en diastole pour une concentration de 4 pour 1000.

II

MODIFICATIONS PHARMACOLOGIQUES DE L'INTOXICATION PAR LE 2489 F.

Les phénomènes cardiotoxiques provoqués chez le chien par le 2489 F. comprennent, comme nous venons de le voir, des troubles de la contraction cardiaque, puis une arythmie ventriculaire anarchique qui prélude le plus souvent à la fibrillation des ventricules.

Il s'imposait de rechercher si certains agents pharmacologiques étaient susceptibles de modifier ce tableau symptomatologique.

Parmi ces agents nous avons choisi :

- des poisons du système nerveux autonome;
- des substances pour lesquelles on a décrit des propriétés antagonistes vis-à-vis de la fibrillation ventriculaire.

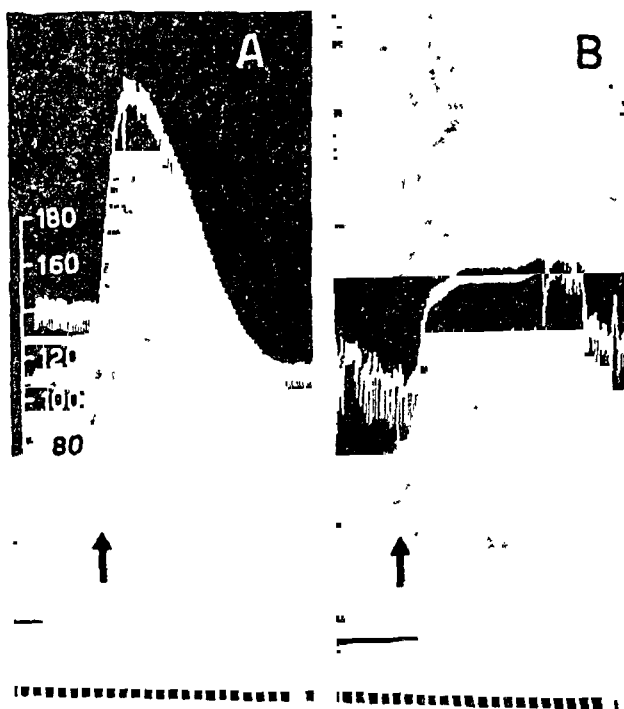


FIG. 7

Action du 2489 F sur l'hypertension adrénalinique et action antagoniste de l'adrénaline vis-à-vis de l'anarchie provoquée par le 2489 F

Expérience du 27-1-48. — Chien ♂ 7 kg, anesthésié à la chloralose.

Les nerfs dépresseurs ont été sectionnés au niveau du cou.

Tracé tensionnel.

Temps en 10 secondes.

A : En ↑ injection i.v. d'adrénaline (10 µg/kg).

Entre A et B : administration i.v. de 2489 F (2 mg/kg).

B : En ↑ : injection i.v. d'adrénaline (10 µg/kg).

L'hypertension adrénalinique est déprimée mais l'adrénaline régularise, transitoirement, le tracé tensionnel.

1. — *Poisons du système nerveux autonome*a) *Poisons du sympathique.*

L'effet de l'adrénaline a été recherché aux différents stades de l'intoxication par le 2489 F chez des animaux à nerfs vagues dépresseurs sectionnés au niveau du cou afin d'éliminer les effets vagues réflexes.

L'hypertension adrénalinique est tout d'abord sensibilisée puis déprimée.

Pendant la phase de l'intoxication larvée, l'injection d'adrénaline (5, 10 et 20 $\mu\text{g/kg}$) ne modifie pas ou peu l'aspect de l'électrocardiogramme. Pendant la phase d'anarchie, par contre, on assiste à une régularisation remarquable du tracé tensionnel (FIG. 7). Cet effet est obtenu avec des doses d'adrénaline relativement élevées (10 $\mu\text{g/kg}$) (à ce moment l'action hypertensive de l'adrénaline a diminué par rapport au témoin); il s'amorce pendant l'hypertension adrénalinique et se termine avec celle-ci; il ne correspond pas à une normalisation complète de l'E.C.G. mais seulement à une régularisation des systoles qui redeviennent identiques entre elles mais présentent encore les déformations caractéristiques du stade précédent (en particulier une onde T très développée).

Il semble que cette régularisation adrénalinique puisse se produire spontanément chez certains animaux intoxiqués par le 2489 F (même si leurs nerfs vagues ne sont pas sectionnés) lorsque la déficience circulatoire provoque des phénomènes asphyxiques et notamment une décharge d'adrénaline par les capsules surrénales (FIG. 8).

Parmi les agents sympatholytiques nous avons examiné le 883 F ou Prosympal (diéthylaminométhyl-benzodioxane) (BOVET et SIMON, 2) : il n'a pas eu d'action appréciable.

b) *Poisons du parasympathique.*

La stimulation du bout périphérique du nerf vague-sympathique cervical et l'administration intraveineuse d'acétylcholine provoquent classiquement chez l'animal normal un block cardiaque suivi de bradycardie et assez souvent une diminution (parfois une inversion) de l'onde T de l'E.C.G.

Ces divers phénomènes s'observent aussi chez l'animal intoxiqué par le 2489 F.

Au stade d'intoxication larvée, on constate que le tracé électro-cardiographique des systoles constitutives de la bradycardie vagale est normalisé car l'onde T a diminué de volume (FIG. 9).

Au stade de l'anarchie, le cœur est devenu moins sensible aux effets



Expérience du 16-12-48. — Chien ♀ 17 kg, anesthésié à la chloralose.

Nerfs vagues intacts. L'animal a reçu 1,75 mg/kg de 2489 F.

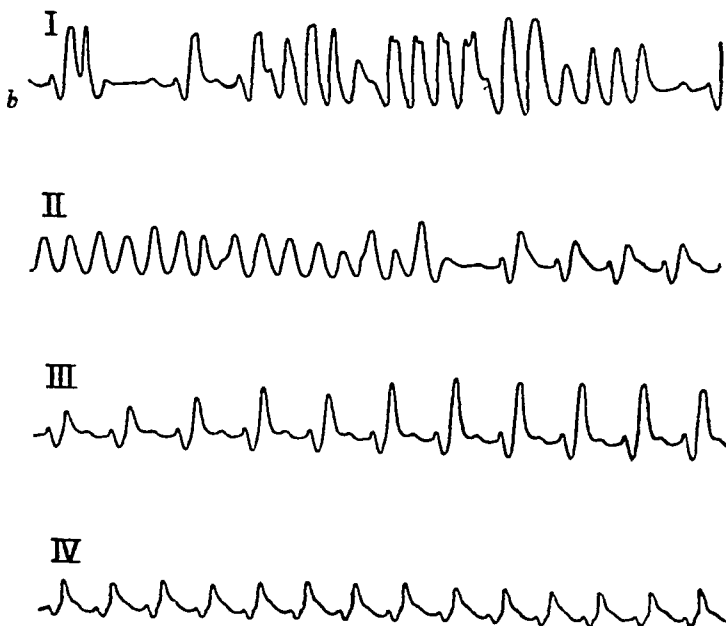
← R : respiration.

P.A. : pression artérielle.

Temps en 10 secondes.

Le tracé de la respiration montre 3 mouvements respiratoires profonds qui traduisent l'asphyxie centrale : aux deux premiers mouvements correspondent des flèches ascensionnelles transitoires de la P.A.

Un troisième mouvement respiratoire profond correspond à une ascension durable de la P.A. avec régularisation définitive du rythme cardiaque. — Ces ascensions tensionnelles avec régularisation correspondent vraisemblablement à des actions adrénaliniques.



← Electrocardiogrammes :

I. Images de l'arythmie (systoles couplées, systole étirée avec T prédominant, flutter).

II. Régularisation : passage brutal d'un flutter à un rythme sinusal ou auriculaire.

III. Pendant l'ascension tensionnelle : rythme régulier sinusal ou auriculaire : exagération considérable de T.

IV. 2 minutes après la régularisation.

FIG. 8

Interruption spontanée d'une anarchie toxique coïncidant avec des phénomènes asphyxiques

de l'excitation vagale et de l'acétylcholine : les stimulations maxima du nerf vague deviennent parfois inefficaces et on doit souvent recourir à d'assez fortes doses d'acétylcholine. Dans ces conditions, le rythme anarchique provoqué par le 2489 F est aboli et le block ainsi que la bradycardie acétylcholinique s'y substituent de façon transitoire; les tracés électriques multiformes font place, après le block complet, à une

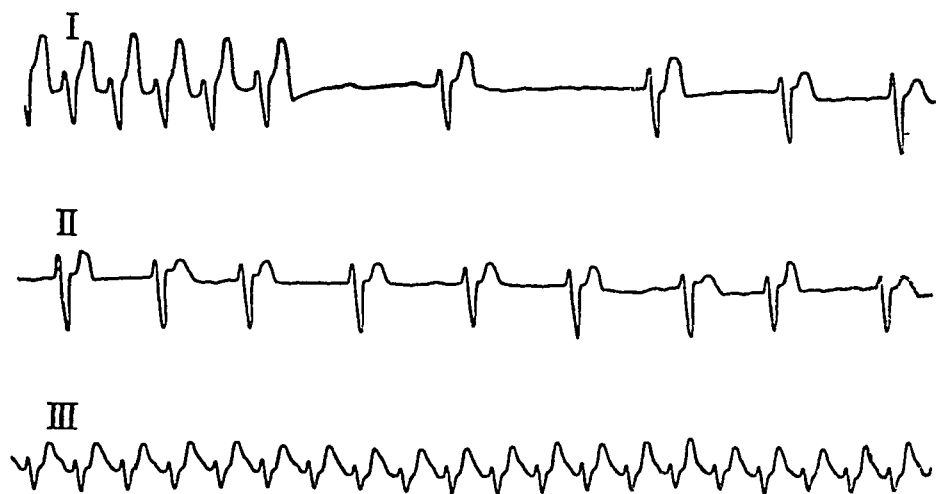


FIG. 9

Action de l'excitation vagale sur les déformations électrocardiographiques du deuxième stade

Expérience du 14-1-48. — Chien ♀ 5 kg, anesthésié à la chloralose.

L'animal a reçu 1 mg/kg de 2489 F.

I. Début de l'excitation vagale (block auriculo ventriculaire et images de flutter auriculaire).

II. Pendant l'excitation vagale : remarquer la diminution d'amplitude de l'onde T.

III. Fin de l'excitation vagale : aspect typique du deuxième stade.

bradycardie normotope avec nette diminution de l'amplitude de l'onde T et restauration d'un intervalle S T (FIG. 10).

La stimulation vagale et l'administration intraveineuse d'acétylcholine s'opposent donc, dans une certaine mesure, à l'anarchie et à l'augmentation de l'amplitude de l'onde T que provoque le 2489 F.

Des effets analogues ont été observés après administration de 2249 F (formal de γ -triméthylammonium propanediol) qui est un agent parasympathomimétique puissant (FOURNEAU, BOVET, BOVET et MONTÉZIN, 18).

Chez le chien préalablement éseriné (0,1 à 0,5 mg/kg) l'évolution de l'intoxication par le 2489 F nous a semblé faiblement ralentie.

Enfin la section préalable des nerfs vagues, l'atropinisation (1 à 2 mg/kg) du chien, avant ou pendant l'intoxication, ne modifient pas

celle-ci de façon appréciable. Le Parpanit (5 à 10 mg/kg) qui paralyse les synapses vagues intracardiaques (HEYMANS et DE VLEESCHOUWER, 20) est également sans action.



FIG. 10

Action de l'acétylcholine sur l'arythmie par le 2489 F

Expérience du 20-1-48. — Chien ♀ 4 kg, anesthésié à la chloralose.

L'animal a reçu une forte dose de 2489 F (5 mg/kg).

I. Complexes arrondis et déformés.

Entre I et II : administration i.v. de 3 mg/kg d'acétylcholine.

II et III : Bradycardie acétylcholinique : les tracés comportent les accidents classiques. En plus des blocks auriculoventriculaires, observer la prépondérance de S et de T.

IV. Fin de la régularisation acétylcholinique.

2. — Substances antifibrillantes

Des propriétés antifibrillantes ont été décrites pour un grand nombre de substances appartenant à des catégories pharmacologiques diverses. — Les données de la littérature ne sont pas toujours concordantes et nous nous bornerons ici à citer les travaux relatifs aux agents que nous avons étudiés :

Le *gravitol* (JACKSON, 27; VAN DONGEN, 50 — inefficace selon DE BOER, 15); les *sels de magnésium* (ROTHBERGER et ZWILLINGER, 37; VON HUEBER et LEHR, 26; MLADOVEANU, VASILEO et GHEORGHIU, 34; SZEKELI, 48 — très peu efficaces selon HOOKER, 25; HOFF, WINKLER et

SMITH, 24; SMITH, WINKLER et HOFF, 46); la *novocaïne* (SHEN, 41, 43, WIGGERS et WEGRIA, 53); la *papavérine* [SAKUSSOW, 38; MELVILLE, 32; LINDNER et KATZ, 28; MAC EACHERN, SMITH et MANNING, 30; ELEK et KATZ, 17; WEGRIA et NICKERSON, 51 — peu efficace selon HEYMANS ⁽¹⁾]; la *quinidine* (FREY, 19; CLERC et PEZZI, 11 — inefficace vis-à-vis de la fibrillation ventriculaire selon HOOKER, 25; MOISSET DE ESPANES, 35); et le 1262 F (Dacorène) (BOVET, FOURNEAU, TRÉFOUËL et STRICKLER, 4; peu efficace selon SHEN, 40, 42).

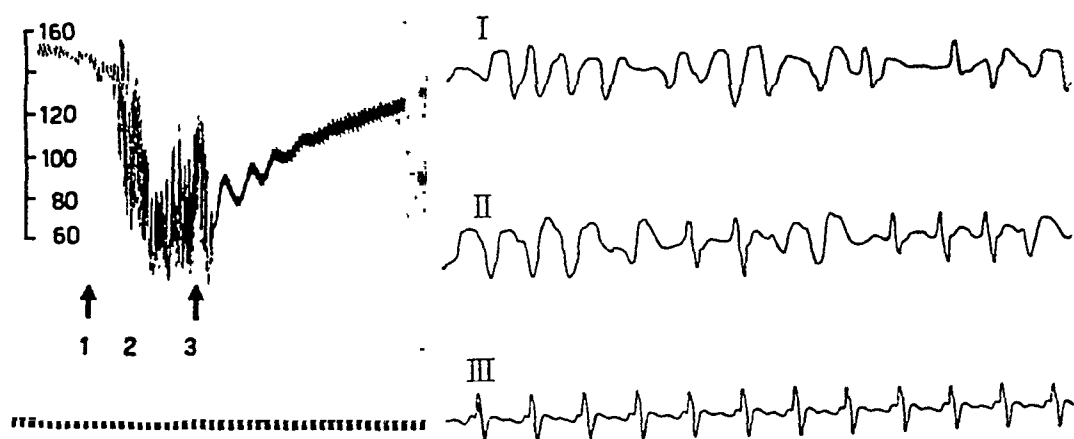


FIG. 11

Action curative du 1262 F vis-à-vis de l'intoxication par le 2489 F

Expérience du 22-11-48. — Chien ♂ 10 kg, anesthésié à la chloralose.

A gauche : Tracé tensionnel.

Temps en 10 secondes.

En \uparrow_1 : injection i.v. de 2489 F (1,5 mg/kg).

En \uparrow_2 et \uparrow_3 injection i.v. de 1262 F (chaque fois : 5 mg/kg) : régularisation du tracé.

A droite : Electrocardiogrammes :

I. Pendant l'anarchie.

II. Interruption de l'anarchie par le 1262 F.

III. 30 secondes plus tard.

La régularisation et la normalisation du tracé sont presque immédiates — (Comparer avec les rétrocessions spontanées des fig. 1 et 10).

a) Le *gravitol* et des vasodilatateurs (le *nitrite d'amyle*, la *trinitrine*, l'*aminophylline*, le *nicotinate de soude*) n'ont aucune action appréciable.

b) Le *chlorure de magnésium*, en solution glucosée ou non, n'a provoqué aucune amélioration des troubles induits par le 2489 F, même pour des doses assez élevées pour provoquer un arrêt respiratoire. Chez deux animaux (sur quatre) qui n'avaient reçu qu'une faible dose

⁽¹⁾ Communication personnelle.

de 2489 F, incapable à elle seule de provoquer de l'anarchie, l'administration de chlorure de magnésium a provoqué un passage, transitoire, du rythme régulier de l'intoxication larvée à une arythmie très semblable à celle du stade de l'anarchie. Le chlorure de magnésium provoquerait donc parfois une aggravation de l'intoxication par le 2489 F.

En ce qui concerne le *chlorure de potassium*, nous n'avons pas utilisé les doses massives qui sont seules capables d'arrêter la fibrillation par

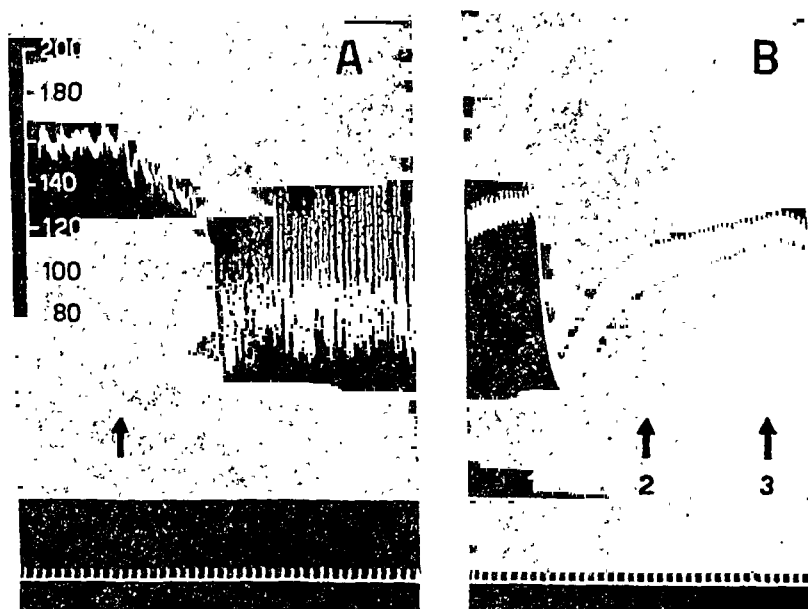


FIG. 12

Action préventive du 1262 F vis-à-vis de l'anarchie provoquée par le 2489 F

Expérience du 25-11-48. — Chien ♂ 11 kg, anesthésié à la chloralose.

Temps en 10 secondes.

A : En \uparrow injection i.v. de 2489 F (1,75 mg/kg).

Tracé anarchique (latence de 1 min. 30 sec.).

B : En \uparrow_1 injection i.v. de 1262 F (10 mg/kg).

En \uparrow_2 et \uparrow_3 injections de 2489 F (chaque fois 2 mg/kg) : le rythme cardiaque reste régulier.

faradisation des ventricules (HOOKER, 25; WIGGERS, 52). De petites doses de chlorure de potassium (10 mg/kg) ont eu pour effet de précipiter la mort de l'animal.

c) La *novocaïne* (5-10 mg/kg), la *papavérine* (5-10 mg/kg) et la *quinidine* (5-10 mg/kg) semblent bien modifier l'anarchie dans un sens favorable, mais cette action est médiocre et, à vrai dire, douteuse : elle se traduit surtout par un ralentissement du rythme cardiaque qui reste irrégulier. L'E.C.G. conserve une configuration très anormale.

d) 1262 F. — Le Dacorène contraste avec les substances précédentes par la netteté et le caractère indubitable de son action antagoniste vis-à-vis du 2489 F. Cet antagonisme s'exerce aussi bien à titre curatif qu'à titre préventif.

De façon curative, le 1262 F (5-10 mg/kg) administré pendant la période d'intoxication larvée, rétablit la configuration normale de l'électrocardiogramme; si cette administration est effectuée pendant l'anarchie, celle-ci régresse totalement : on assiste alors à une ascension régulière de la pression, au retour des battements du cœur à un rythme normal et à une saisissante normalisation de l'E.C.G. (FIG. 11).

De façon préventive, l'administration de 5 à 10 mg/kg de 1262 F prévient les effets toxiques de deux fois, trois fois et même parfois quatre fois la dose de 2489 F qui provoquait, chez le même animal, l'apparition de l'anarchie (FIG. 12).

Effets curatifs et effets préventifs ont pu être tous deux mis en évidence au cours d'expériences où 2489 F et 1262 F ont été injectés, de façon alternative, à doses progressivement croissantes. Nous avons ainsi rendu trois ou quatre fois de suite, le cœur d'un chien chloralosé arythmique et à nouveau régulier. — D'autres dérivés, synthétisés par MARINO-POULOS (31) ont présenté des propriétés similaires.

DISCUSSION

Le 2489 F (4-amino-4'-diéthylaminopropylamino-diphénylsulfone) provoque donc des phénomènes cardiaques, d'abord bénéficiaires mais très transitoires, et ensuite déficitaires et graves.

Ces derniers sont caractérisés :

— tout d'abord, par des déformations électrocardiographiques intenses et très typiques, dont la signification reste cependant imprécise;

— et ensuite, par une arythmie ventriculaire dont les symptômes essentiels sont, chez le chien, un automatisme ventriculaire exagéré et des troubles de la conduction intraventriculaire. Ce sont là précisément les symptômes qui sont observés dans les tachycardies ventriculaires préfibrillatoires rencontrées en clinique (29) et qui constituent aussi la première étape des troubles cardiaques succédant, chez l'animal, à la ligature des coronaires (LEWIS, 29); ce sont aussi ceux qui, selon NAHUM et HOFF (36) doivent être combinés pour qu'une fibrillation ventriculaire apparaisse après administration d'autres toxiques cardiaques. — Chez le chien, c'est effectivement à un état fibrillatoire mortel des ventricules que prélude le plus souvent l'arythmie toxique par le 2489 F.

Le 2489 F peut donc être considéré comme une substance apparentée, pharmacologiquement, aux cardiotoxiques fibrillants tels que les chlorures de baryum, de calcium, de potassium, les corps digitaliques, l'aconitine, etc.

Ces caractéristiques montrent qu'il n'est pas possible de rattacher le 2489 F au groupe des poisons sympathomimétiques ou parasymphomimétiques. Ceci est confirmé par l'inefficacité du 883 F et de l'atropine et par l'antagonisme partiel qu'exercent l'acétylcholine et l'adrénaline vis-à-vis de l'intoxication par ce dérivé.

L'action antagoniste de l'acétylcholine résulte vraisemblablement, avant tout, de la suppression des foyers d'excitation hétérotopes car on voit l'anarchie faire place à une bradycardie normotope transitoire : c'est à un tel mécanisme que HOFF et NAHUM (21, 22) attribuent l'action antifibrillante de l'acétyl- β -méthylcholine.

La régularisation réalisée par l'adrénaline est d'interprétation malaisée. Elle peut être mise en rapport avec des résultats obtenus par DOUGLAS (16), SMITH et MULDER (45), SMITH (44) et MELVILLE (32), selon lesquels cette hormone prévient ou rend moins sévères certaines fibrillations ventriculaires. On peut invoquer l'action dromotrope positive de l'adrénaline qui s'opposerait aux troubles de la conduction provoqués par le 2489 F, son pouvoir coronodilatateur et un renforcement de l'activité du pace maker qui recouvrerait son rôle. Mais on sait que les phénomènes adrénaliniques sont très complexes au niveau du myocarde (BURN, 6).

A priori cette action régularisatrice paraissait étrange car l'adrénaline favorise souvent l'apparition de rythmes ectopiques et même de la fibrillation ventriculaire.

Toutefois on doit considérer qu'elle est réalisée :

- 1) à un moment où l'hypertension adrénalinique est déprimée;
- 2) chez un animal à nerfs vagues dépresseurs sectionnés ou partiellement mis hors fonction par le 2489 F.

On connaît l'importance du facteur « bond hypertensif » dans la genèse de la fibrillation adrénalinochloroformique (SHEN, 39 à 43; DAUTREBANDE et CHARLIER, 12) et celle de la dépression réflexe du pace maker pour l'apparition de rythmes ectopiques adrénaliniques chez l'animal normal (ALLEN, 1; HOFF et NAHUM, 21). Dès lors on s'étonne moins de ne pas assister à une aggravation de l'arythmie.

La plupart des substances dites « antifibrillantes » que nous avons étudiées se sont révélées pas ou peu actives vis-à-vis de l'intoxication par le 2489 F. — Les travaux qui ont été cités plus haut montrent que l'accord est loin d'être réalisé sur leur efficacité et nous n'envisagerons ici que le cas très particulier du Dacorène (1262 F).

Ce dérivé de synthèse contraste avec tous les agents pharmacologiques que nous avons étudiés, y compris l'adrénaline et l'acétylcholine, par

le caractère net et *complet* de l'antagonisme qu'il manifeste vis-à-vis des troubles cardiotoxiques provoqués par le 2489 F. Le rythme cardiaque est régularisé sans qu'apparaissent une bradycardie ou une tachycardie; le tracé électrocardiographique de chaque systole redevient rapidement tout à fait normal. — On peut interpréter cet antagonisme dans une certaine mesure, en rappelant que deux des propriétés essentielles du 1262 F sont (4, 5, 47, 49) :

a) Le pouvoir d'antagoniser des rythmes ectopiques divers (arythmies toxiques par l'adrénaline, le chlorure de baryum, l'aconitine, le véraltrine; fibrillation électrique).

b) Une action dromotrope positive qui se manifeste par exemple vis-à-vis du block cardiaque provoqué chez le cobaye par l'acide adénosine phosphorique.

Ce sont là deux propriétés exactement opposées à celles du 2489 F.

Toutefois, le 1262 F possède encore d'autres propriétés qui ont été mises en rapport avec son pouvoir antifibrillant : il allonge la période réfractaire du cœur de grenouille (4); il est aussi un coronarodilatateur actif (CAVALLINI, 8). — Nous avons donc cherché à savoir si le 2489 F raccourcissait la période réfractaire : nos essais, réalisés sur l'oreillette isolée, selon la technique de DAWES (13) n'ont pas fourni des résultats concordants. — D'autre part, l'inefficacité de plusieurs coronodilatateurs (nitrite d'amyle, etc.) ne plaide pas pour une origine coronarienne des troubles cardiotoxiques provoqués par le 2489 F (cf. l'hypothèse de MELVILLE, 32, 33).

D'autres hypothèses, impliquant des processus biochimiques au niveau du cœur lui-même, se présentent à l'esprit, mais il est prématuré d'en parler ici.

En tout état de cause le 2489 F et le 1262 F montrent une forme d'antagonisme que l'on ne faisait que soupçonner au niveau d'un organe où les actions pharmacologiques sont souvent très intriquées et l'étude de cet antagonisme peut être susceptible d'apporter quelques éléments nouveaux à la compréhension du mode d'action des poisons cardiaques.

RÉSUMÉ

1) Chez le chien, les symptômes de l'intoxication par le 2489 F (4-amino-4'-diéthylaminopropylamino-diphénylsulfone) sont presque exclusivement cardiaques. — Le premier stade de cette intoxication, souvent peu marqué, correspond à des effets cardiotoniques; le second

est caractérisé par des déformations électrocardiographiques dont l'intensité contraste avec le maintien de la pression artérielle à la normale et la régularité du rythme cardiaque; le troisième, par une arythmie ventriculaire dont les éléments essentiels sont l'existence de foyers d'excitation hétérotopes et des troubles de la conduction intraventriculaire. A ce dernier stade, l'action du produit se montre généralement réversible, en dépit de la sévérité des troubles enregistrés. — La mort survient le plus souvent par fibrillation ventriculaire.

2) Pour 25 chiens, la dose nécessaire pour provoquer l'arythmie ventriculaire a été en moyenne de 1,4 mg/kg.

3) Chez le lapin, le cobaye, la souris et la grenouille, des troubles nerveux apparaissent également; ils n'ont pas été observés chez le chien.

4) L'adrénaline et l'acétylcholine font toutes deux rétrocéder l'arythmie ventriculaire.

5) Le Prosympal (883 F), l'atropine, le parpanit, le nitrite d'amyle, la trinitrine, l'aminophylline, le nicotinate de soude, le gravitol et le chlorure de magnésium n'ont pas eu d'action bénéficiaire sur l'arythmie toxique. La novocaïne, la papavérine et la quinidine semblent l'améliorer médiocrement.

6) Le 1262 F (2-diéthylaminoéthoxy-diphényle) ou Dacorène possède une action antagoniste complète vis-à-vis des modifications électrocardiographiques et de l'arythmie provoquées par le 2489 F.

7) Ces faits font l'objet d'une discussion.

SUMMARY

1) 4-amino-4'-diethylaminopropyl-diphenylsulfone (2489 F) is shown to be cardiotoxic for the dog.

Essential features of this intoxication are :

- in a first stage, slight cardiotonic effects;
- in a second stage, electrocardiographic disturbances, the intensity of which contrasts with the regularity of the cardiac rhythm;
- in a third stage, severe ventricular arrhythmia, characterized by automaticity of intraventricular structures and slowing of intraventricular conduction; at this stage, the intoxication is still generally reversible.

Death results often from ventricular fibrillation, the auricles continuing to beat regularly.

2) In 25 dogs the mean dose necessary to provoke ventricular arrhythmia was 1,4 mg/kg.

3) In rabbit, guinea pig, mouse and frog, signs of central nervous stimulation or depression also occurred; they were not seen in the dog.

4) Epinephrine and acetylcholine both oppose transitorily the toxic arrhythmia.

5) Prosympal (883 F), atropine, parpanit, amyl nitrite, trinitrine, aminophylline, sodium nicotinate, magnesium chloride, are all ineffective as antagonists. Procaine, papaverine and quinidine have little action.

6) (1262 F) 2-diéthylaminodiphenyl or Dacorène antagonizes the cardiac disturbances completely.

7) These facts are discussed.

BIBLIOGRAPHIE

1. — ALLEN, W. F. *J. Pharmacol.*, 1934, 50, 70.
2. — BOVET, D. et SIMON, A. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1937, 55, 15.
3. — BOVET, D., BOVET-NITTI, F., TRÉFOUËL, T.-J., BEAUGEARD, N. *C. R. Ac. Sc.*, 1946, 222, 1520.
4. — BOVET, D., FOURNEAU, E., TRÉFOUËL, J. et STRICKLER, H. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1939, 52, 234.
5. — BOVET, D., TRÉFOUËL, J., STERNE, J. et STRICKLER, H. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, 130, 29.
6. — BURN, J. H. *Physiol. Rev.*, 1945, 25, 377.
7. — BYER, E., TOTH, L. A. et ASHMAN, R. *Amer. J. Physiol.*, 1947, 149, 264.
8. — CAVALLINI, G. *Il Farmaco*, 1946, 1, 11.
9. — CHENOWETH, M. B. et GILMAN, A. *J. Pharmacol.*, 1946, 87, 90.
10. — CHENOWETH, M. B. et GILMAN, A. *Bull. U. S. Army Med. Dpt* 1947, 7, 687.
11. — CLERC, A. et PEZZI, C. *Paris Médical*, 1921, 440.
12. — DAUTREBANDE, L. et CHARLIER, R. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, 132, 292.
13. — DAWES, G. S. *Brit. J. Pharmacol.*, 1946, 1, 90.
14. — DE BOER, S. *Ergebn. Physiol.*, 1923, 21, 1.
15. — DE BOER, S. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1936, 54, 65.
16. — DOUGLAS, B. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 91, 1419.
17. — ELEK, S. R. et KATZ, L. N. *J. Pharmacol.*, 1942, 74, 335.

18. — FOURNEAU, E., BOVET, D., BOVET, F., MONTÉZIN, G. *Bull. Soc. Ch. Biol.*, 1944, 26, 516.
19. — FREY, W. *Berl. kl. Woch.*, 1918, pp. 417, 450 et 849.
20. — HEYMANS, C. et DE VLEESCHHOUWER, G. R. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1946, 75, 307.
21. — HOFF, H. E. et NAHUM, L. H. *J. Pharmacol.*, 1934, 52, 235.
22. — HOFF, H. E. et NAHUM, L. H. *Amer. J. Physiol.*, 1935, 110, 675.
23. — HOFF, H. E. et NAHUM, L. H. *Amer. J. Physiol.*, 1941, 131, 700.
24. — HOFF, H. E., WINKLER A. W. et SMITH. P. K. *Amer. J. Physiol.*, 1939, 126, 537.
25. — HOOKER, D. R. *Amer. J. Physiol.*, 1929, 91, 305.
26. — VON HUEBER, E. F. et LEHR, D. *Arch. exp. Pathol.*, 1938, 189, 25.
27. — JACKSON, D. E. *J. Pharmacol.*, 1930, 39, 254.
28. — LINDNER, E. et KATZ, L. N. *Amer. J. Physiol.*, 1941, 133, 155.
29. — LUTEMBACHER, R. in : *Nouveau Traité de Médecine*, de ROGER G. H., WIDAL, F., et TEISSIER, P. J. Fascicule X, tome I, Masson & Cie, Édit. Paris (1933).
30. — MAC EACHERN, C. G., SMITH, F. H. et MANNING, G. W. *Amer. Heart. J.*, 1941, 21, 25.
31. — MARINOPOULOS, D. « Synthèse et actions physiologique et antibactérienne des dérivés aminés et hydroxylés du stilbène », *Thèse Doct. Sc. Paris*, (1947).
32. — MELVILLE, K. I. *J. Pharmacol.*, 1939, 66, 107.
33. — MELVILLE, K. I. *J. Pharmacol.*, 1946, 87, 350.
34. — MLADOVEANU, C., VASILEO, O. et GHEORGHIU, P. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1939, 63, 494.
35. — MOISSET DE ESPANES, E. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 233.
36. — NAHUM, L. H. et HOFF, H. E. *J. Pharmacol.*, 1939, 65, 322.
37. — ROTHBERGER, C. J. et ZWILLINGER, L. *Arch. f. exp. Pathol. & Pharmacol.*, 1936, 181, 301.
38. — SAKUSSOW, W. W. *Arch. f. exp. Pathol. & Pharmacol.*, 1929, 144, 331.
39. — SHEN, T. C. R. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1938, 59, 243.
40. — SHEN, T. C. R. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, 132, 52.
41. — SHEN, T. C. R. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1939, 61, 43.
42. — SHEN, T. C. R. et MARRI, R. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1940, 64, 58.
43. — SHEN, T. C. R. et SIMON, M. A. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1938, 59, 68.
44. — SMITH, D. C. *J. Pharmacol.*, 1936, 58, 312.
45. — SMITH, D. C. et MULDER, A. G. *Am. J. Physiol.*, 1936, 115, 507.

- 46. — SMITH, P. K., WINKLER, A. W. et HOFF, H. E. *Am. J. Physiol.*, 1939, 126, 720.
- 47. — STERNE, J., BOVET, D. et HENRY, C. *C.R. Soc. Biol.*, 1939, 130, 209.
- 48. — SZEKELI, P. *Brit. Heart J.*, 1946, 8, 115.
- 49. — TRÉFOUËL, J., STRICKLER, H. et BOVET, D. *C.R. Soc. Biol.*, 1939, 130, 27.
- 50. — VAN DONGEN, K. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1936, 53, 80.
- 51. — WEGRIA, R., et NICKERSON, N. D. *J. Pharmacol.*, 1942, 75, 50.
- 52. — WIGGERS, C. J. *Am. J. Physiol.*, 1930, 93, 197.
- 53. — WIGGERS, C. J., et WEGRIA, R. *Am. J. Physiol.*, 1940, 131, 296.

AUS DER CHIRURGISCHEN UNIVERSITÄTSKLINIK IN FREIBURG/BRSG.
DIREKTOR : PROF. DR. E. REHN

AKTIVIERUNG DER FIBRINOLYSE DURCH PHOSPHOLIPOIDE IN VITRO UND IN VIVO

I. Mitteilung

VON

TH. HALSE

(Eingegangen am 22-3-1949).

In letzter Zeit sind einige Arbeiten erschienen, die das Verhalten der Fibrinolyse in vitro unter Einwirkung von Thrombokinase und verschiedenen Gewebsextrakten zum Gegenstand hatten. Über die Beschleunigung des Fibrinabbaues durch Thrombokinase wurde von NOLF bereits im Jahre 1913 berichtet, später in etwas modifizierter Form (1938), wobei dem Thrombozym die Eigenschaften der eigentlichen Thrombokinase und des Fibrinolysins, dem Thrombogen (nach der NOLF'schen Nomenklatur) die des Prothrombins und des Antifibrinolysins zukommen soll. In jüngster Zeit wiesen MAC FARLANE und PILLING (1946) nach, dass fibrinolytisches und koagulierendes Wirkungsvermögen bei Lungenextrakten weitgehend parallel läuft. Dagegen gelang es MILSTONE (1948) nicht, eine proteolytische Aktivität für ein von ihm benutztes Thrombokinasepräparat nachzuweisen.

Bemerkenswert sind vor allem die Berichte von ASTRUP und PERMIN (1947). Diese Autoren konnten mit qualitativer Methodik (Makroskopische Beobachtung eines Plasmatropfens) zeigen, dass aus verschiedenen Geweben mit Aceton und Äther eine Substanz, „Fibrinokinase“, gewonnen wird, die den Abbau des Rinderfibrins beschleunigt. Die wässrigen Extrakte ergaben dagegen keine Wirksamkeit.

Diese Mitteilungen geben uns Anlass, von eigenen Beobachtungen zu berichten, die wir über Aktivierung der Fibrinolyse in vitro und in vivo machen konnten, worauf auch in anderem Zusammenhang bereits hingewiesen wurde (4, 5). Vor allem glauben wir — nachdem nun-

mehr diese Fragen zur Debatte gestellt werden — auf Befunde aufmerksam machen zu müssen, die vielleicht geeignet wären, Fehlschlüsse zu vermeiden, und u. E. zur Klärung offener Widersprüche einiger Mitteilungen beitragen könnten.

Hinsichtlich Methodik muss im Einzelnen auf früheren Publikationen verwiesen werden (5). Es sei hier nur vermerkt, dass wir seit einigen Jahren nach einem kjeldahlometrischen Verfahren arbeiten, das eine direkte, quantitative Messung des Fibrinabbaues in zitiertem Plasma ermöglicht, wobei die mittlere Abweichung unter $\pm 2\%$ liegt. Grundsätzlich wurde bei diesen Versuchen — um Fehlerquellen durch Änderungen des nativen Milieus möglichst auszuschliessen — unverdünntes Menschenplasma verwendet.

Aus der nachstehenden graphischen Darstellung (ABB. 1) ist das Verhalten der Fibrinolyse nach Zusatz von steigenden Dosen Thrombokinase zu entnehmen. Es handelt sich bei der angewandten Substanz um ein stark gerinnungsaktives Rohpräparat aus Humangehirn. Die Corticalis wurde nach 24-stündigem Trocknen bei 56° ohne weitere Aufarbeitung direkt als Trockensubstanz verwendet. Zusatz des Präparates zum Plasma vor dem Recalcifizieren, sodann Bebrütung 24 Stunden bei 37° C. Um eine evt. *ph*-Verschiebung des Systems durch den Zusatz zu vermeiden, wurden die Ansätze mit Veronalpuffer auf *ph* 7,3 eingestellt. Die Fibrinabbauwerte sind übersichtshalber auf die Ordinate in Prozent eingetragen.

Mit zunehmender Thrombokinasekonzentration tritt also in den 4 Versuchsserien mit Plasma von verschiedenen Spendern eine erhebliche Steigerung der Fibrinolyse ein, mit 20 mg Thrombokinase/0,5 ccm Plasma um fast 40 % im Mittel. Bemerkenswert ist dabei übrigens die grosse Streuung, die durch das verschiedene individuelle Verhalten

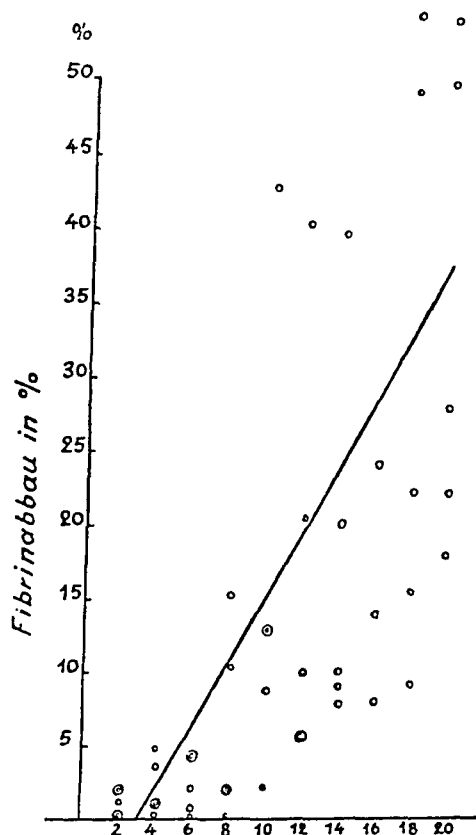


ABB. 1

mg Thrombokinase / 0,5 ccm NaCl-Lsg
+ 0,5 ccm Plasma

Zusatz vor der Gerinnung.

der Einzelplasman bedingt ist. Während bei einigen Proben mit steigender Konzentration eine fast lineare Zunahme des Fibrinabbaues erfolgt, wird schon mit kleinen Dosen bei anderen das Optimum erreicht. Diese an sich interessante Erscheinung muss jedoch in diesem Zusammenhang übergangen werden. Setzen wir nun das aus 0,5 ccm Zitrat-

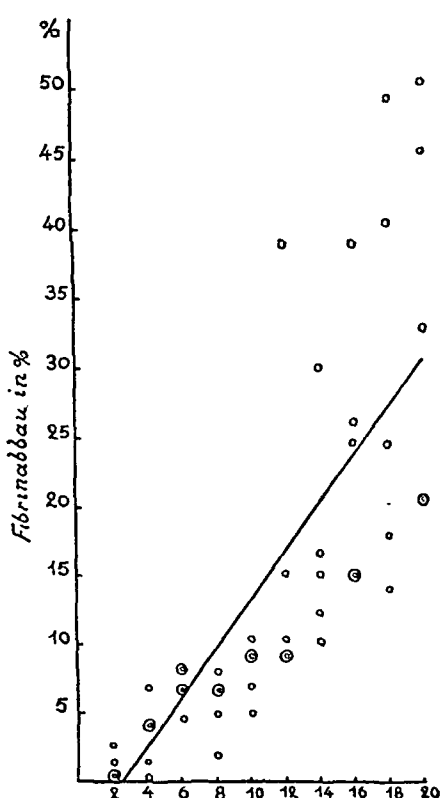


ABB. 2

mg Thrombokinasen/0,3 ccm phys. NaCl-Lsg. zu einem Fibrin-Serum-System.

Gerinnsel aus 0,5 ccm Plasma.

plasma gewonnenen Gerinnsel zu 0,5 physiologische NaCl-Lösung und beschicken dieses System mit steigenden Dosen unseres Präparates, tritt auffallenderweise ebenfalls eine erhebliche Zunahme der Fibrinabbau-Fähigkeit ein (ABB. 2), wenn auch in deutlich schwächerem Masse als in den vorangehenden Versuchen.

Die nächste Abbildung zeigt den zeitlichen Reaktionsverlauf der Fibrinolyse im recalcifizierten, menschlichen Zitratplasma nach Beschickung der Ansätze mit verschiedenen Thrombokinasenpräparaten (ABB. 3).

In der Blindprobe (I) ist nur ein Fibrinabbau von etwa 5 % nach 24-stündiger Bebrütung festzustellen. Eine gewisse Verstärkung der Fibrinolyse lässt sich mit 20 mg eines Kinasepräparates aus Kaninchenhirn erreichen (II), noch stärker ist der Effekt mit 20 mg des Handelspräparates „Thrombokinasen Roche“ (III), die deutlichste Wirkung zeigt aber dieselbe Menge des Rohpräparates aus Humangehirn (IV).

Hier ist schon nach 6 Stunden ein maximaler Fibrinabbau vorhanden. Besonders beachtenswert ist nun, dass das gleiche Ergebnis sowohl hinsichtlich Reaktionsverlauf des Prozesses wie auch quantitativ, mit 1 mg Lecithin (Lecithinum ex ovo puriss. „Merck“) zustandekommt (V). Die naheliegende Vermutung, dass die lysierende Wirkung der verschiedenen Kinase-Präparate durch ihren variierenden Lipoidgehalt zu erklären ist, lässt sich mit dem Resultat der quantitativen Lipoidphosphoranalyse (Nach THEORELL-NORDBERG) der benutzten Substanzen erhärten. Das schwach wirksame Kaninchenhirnpräparat ergibt ein Gehalt von 3,6 g %, während die „Roche-Thrombokinasen“ 4,2 g %

und das Rohpräparat aus Corticals verständlicherweise am meisten, nämlich 4,6 g % Lipoid-Phosphor, zeigen. Auffallend ist, dass 1 mg reines Lecithin einen dem 20 mg Rohthrombokinese äquivalenten Effekt aufweist. Wie weitere Untersuchungen lehrten, ergab eine

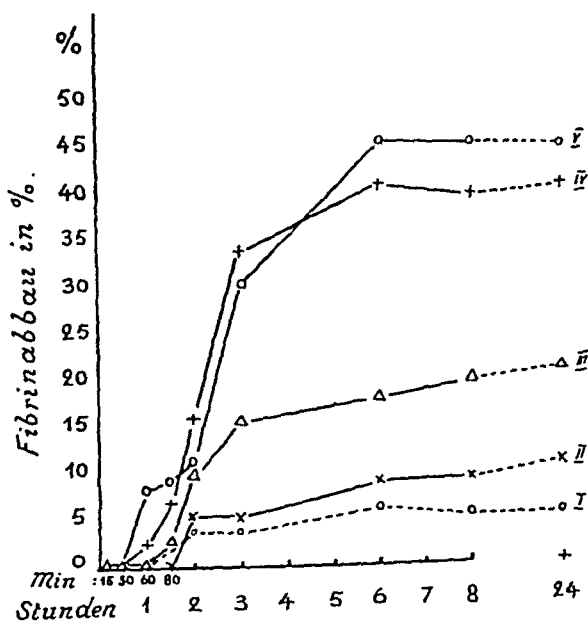


ABB. 3

- | | |
|---|--|
| I. Kontrolle (0,5 ccm Plasma + 0,5 ccm NaCl-Lsg); | |
| II. 20 mg Kaninchen-Tbk | } in 0,5 ccm phys. NaCl-Lsg + 0,5 ccm Plasma |
| III. 20 mg H.L.R.-Tbk | |
| IV. 20 mg Human-Roh-Tbk | |
| V. 4 mg Lecithin | |

Mischung von Kaninchen- und Rohthrombokinese hinsichtlich lytische Wirkung fast genau das arithmetische Mittel der beiden Einzelkomponente.

Eine Fraktionierung des verwendeten Rohpräparates weist für die wässrige- und Ätherphase ein grundsätzlich divergierendes Verhalten auf, wie aus der Tabelle zu entnehmen ist (TAB. I).

Es geht deutlich hervor, dass der durch Ätherauszug gewonnene und mit physiologischer NaCl-Lösung aufgenommene Rückstand im Vergleich zum Ausgangspräparat eine erheblich verstärkte Fibrinolyse hervorruft, wenn man die Substanz-Menge berücksichtigt sogar um ein vielfaches. Dagegen lässt die restliche wässrige Phase eine Wirkung praktisch vermissen. Der unbedeutende Effekt liesse sich durch Verunreinigungen mit ätherlöslichen Bestandteile erklären, die mit weiterer Reinigung verschwinden.

Bemerkenswert ist ferner die Beobachtung, dass durch Mischung

TAB. I

Prozentuale Zunahme der Fibrinolyse im Plasma nach Zusatz von Thrombokinase (Rohpräparat aus Humangehirn) und verschiedene Fraktionen. (Bebrütung 24 Std.)

	I	II	III	IV	V	M
	%	%	%	%	%	%
20 mg Th./0,5 ccm NaCl-Lsg + 0,5 ccm Puffer-Lsg + 0,5 ccm Plasma + 0,5 ccm CaCl ₂ -Lsg	51	49	47	52	48	49 ± 2,1
Ätherphase 8 mg/0,5 ccm NaCl-Lsg + 0,5 ccm Puffer-Lsg + 0,5 ccm Plasma + 0,5 ccm CaCl ₂ -Lsg	63	64	66	64	97	65 ± 1,6
Wässrige Phase 12 mg/0,5 ccm NaCl-Lsg + 0,5 ccm Puffer-Lsg + 0,5 ccm Plasma + 0,5 ccm CaCl ₂ -Lsg	15	19	16	17	19	19 ± 1,8
Äther + wässrige Phase 20 mg/0,5 ccm NaCl-Lsg + 0,5 ccm Puffer-Lsg + 0,5 ccm Plasma + 0,5 ccm CaCl ₂ -Lsg	42	47	41	48	44	44 ± 3,0

dieser beiden Phasen die Anfangswirkung des Ausgangsmaterials wieder erreicht wird.

Wir halten uns somit zu dem Schluss berechtigt, dass die Aktivierung des fibrinolytischen Prozesses an die Lipoidfraktion der Thrombokinase gebunden ist, die Träger dieser Wirkung ist.

Hieraus leitet sich zwangsläufig der Versuch mit reinen Phosphatiden ab, dessen Ergebnisse an Hand der nachstehenden Tabelle (TAB. II) zu besprechen sind. Wir haben hier die kjeldahlometrisch ermittelten Fibrinwerte in mg % nach 24-stündiger Bebrütung angeführt. In 4 Parallellreihen wurden die Ansätze mit a) steigenden Dosen animalischem Lecithin (Lecithinum ex ovo puriss. „Merck“) und b) vegetabilischem Lecithin („Merck“) vor der Gerinnung beschickt.

Durch diese beiden Präparate liessen sich mit steigenden Dosen eine starke Beschleunigung des Fibrinabbaues im Vergleich zum Kontroll-Ansatz erzielen, mit Eierlecithin etwas kräftiger als mit Pflanzen-Lecithin. Es folgt hieraus, dass die lysierende Wirkung durch die Lipoidkomponente

TAB. II

Das Verhalten der Fibrinwerte in mg % (Bebrütung 24 Std.) nach Zusatz von Eier- u. Pflanzenlecithin

Dosis	Fibrinwerte n. 24 Std.				M	
	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %	
2,5 mg	175	175	192	192	181 \pm 7,7	Lecithin ex ovo
2,0 mg	208	218	204	222	213 \pm 8,4	
1,5 mg	242	334	248	248	243 \pm 6,6	
1,0 mg	245	242	248	248	246 \pm 2,8	
0,5 mg	298	182	296	292	292 \pm 7,4	
Kontrolle	350	342	348	354	348 \pm 5,0	
2,5 mg	208	214	218	204	211 \pm 6,2	Pflanzen- Lecithin
2,0 mg	234	242	248	242	241 \pm 5,7	
1,5 mg	248	252	246	246	248 \pm 2,8	
1,0 mg	256	252	248	259	254 \pm 4,7	
0,5 mg	298	305	318	312	308 \pm 3,0	

der Thrombokinase mit grosser Wahrscheinlichkeit eine unspezifische ist, die grundsätzlich der Lipide zukommt. Man könnte an einen physikalischen Effekt denken, sind ja gerade die Lipide in hohem Masse oberflächenaktiv. Auch weitere, hier nicht näher zu erörternde Befunde sprechen in diese Richtung. Sollte die Hypothese sich bestätigen lassen, müsste jedoch die Bedeutung des spezifischen Aktivators „Fibrinokinase“ erst näher definiert und im Lichte dieser Erkenntnisse überprüft werden.

Bevor die Einzelvorgänge bei der Fibrinolyse, die Rolle und Eigenschaften des Fermentes, seine Aktivatoren und Inhibitoren, näher geklärt sind, haben wir es für zweckmässig gehalten, mit dem übergeordneten Begriff „Fibrinolytisches Potential“ zu arbeiten. Wir verstehen hierunter die mit Einbezug der Einzelvorgänge und Komponente nach Bebrütung des unverdünnten, oder möglichst unverdünnten Plasma, erfassbaren Wert der fibrinolytischen Aktionsfähigkeit analog wie wir mit dem QUICK'schen Einstufenmethode gemessenen Prothrombins von „Prothrombin-Potential“ sprechen, um die Mitbeteiligung der Aktivatoren auch in diesem Komplex zum Ausdruck zu bringen.

Vorwegnehmend sei schliesslich bemerkt, dass auch in vivo — sowohl beim Menschen als bei Laboratoriumstieren — sich eine enge Relation zwischen Serumphosphatiden und fibrinolytischem Potential nachweisen lässt. Hierüber soll an dieser Stelle in einer weiteren Mitteilung berichtet werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit ausgangspunkt in Mitteilungen über Aktivierung der Fibrinolyse in vitro mit Thrombokinase und Ätherextrakte aus verschiedenen Geweben werden eigene Befunde zu diesem Thema dargelegt. Es konnte an Hand von Menschenblut mit quantitativer Methodik gezeigt werden, dass die lytische Wirkung der Thrombokinase an seine Lipidkomponente gebunden ist. Der Lipoideffekt ist allen Anschein nach ein unspezifischer, wahrscheinlich physikalischer Natur, und wird auch mit animalischen und vegetabilischen Lecithinpräparaten ausgelöst.

LITERATUR

1. — ASTRUP u. PERMIN. *Nature*, 1947, 159, 681.
2. — ASTRUP u. PERMIN. *Nature*, 1948, 161, 689.
3. — ASTRUP u. PERMIN. Skandinavischer Physiol. Kongress, Oslo, 1948.
4. — HALSE. *Klin. Wschr.*, 1946, 13/16, 121.
5. — HALSE. Fibrinolyse. Eine exp. und klin. Studie zur IV Phase der Blutgerinnung. Editio Cantor, Freiburg/Brsg. 1948.
6. — HALSE u. NATUSCH. *Pharmazie*, 1949, 20.
7. — MACFARLANE u. PILLING. *Lancet*, 1946, 1, 888.
8. — MILSTONE. *Science*, 1947, 106, 546.
9. — NOLF. *Ergebn. inn. Med.*, 1913, 10, 275.
10. — NOLF. *Medicin*, 1938, 17, 381.
11. — NOLF. *Schweiz. med. Wschr.*, 1945, 75, 78.
12. — THEORELL u. NORDBERG. *Biochem. Z.*, 1933, 264, 310.
13. — THEORELL u. NORDBERG. *Biochem. Z.*, 1934, 269, 1.

UNIVERSITÉ DE LIÈGE

LABORATOIRE DE PHARMACODYNAMIE (FACULTÉ DE MÉDECINE) ET
LABORATOIRES DE BIOCHIMIE (INSTITUT SUPÉRIEUR D'ÉDUCATION PHYSIQUE)ACTION STIMULANTE RESPIRATOIRE
DES ACÉTYLSALICYLAMIDES

PAR

E. PHILIPPOT ET M. J. DALLEMAGNE

(Travail reçu le 24-3-1949).

La littérature fournit peu de renseignements en ce qui concerne la pharmacodynamie de la salicylamide : son emploi thérapeutique est tout à fait négligé. Un certain nombre d'observations datant de la fin du siècle dernier ont été recueillies par HOUBEN. Des données plus précises proviennent de NEBELTHAU (1895) : il mentionne l'hypotension que le produit administré par voie intraveineuse occasionne au chat et au chien ; d'après cet auteur, la respiration d'abord accélérée se déprime bientôt. Il signale également avoir reconnu des propriétés analgésiques à l'éther acétylique de la salicylamide. A peu près à la même époque, BAAS (1890) et BONDZYNSKI (1897) n'arrivent pas à se mettre d'accord au sujet de la résorption intestinale de la salicylamide. D'autres auteurs ont étudié le métabolisme du produit, sa sulfoconjugaison et son hydrolyse libérant de l'acide salicylique ; ces données sont résumées dans l'ouvrage récent de WILLIAMS (1947).

En outre, COLLETT (1923) et ANSELMINO (1928) ont cherché à déterminer si la salicylamide obéissait aux mêmes lois physico-chimiques que les anesthésiques courants et KITANO (1927) a étudié l'action narcotique du produit sur le lapin.

L'action analgésique de la salicylamide vient d'être rappelée à l'attention par deux publications récentes, celle de ICHNIOWSKI et HUEPER (1946) et celle de HART (1947). Les premiers signalent que la salicylamide exerce une action dépressive supérieure à celle de l'aspirine tout en n'étant pas plus toxique et que son sort dans l'organisme doit être

différent de celui de cette dernière. HART prend également l'aspirine comme élément de comparaison, mais étend celle-ci à d'autres dérivés, l'acide salicylique, l'O-acétylsalicylamide et la N-acétylsalicylamide. D'après lui, ces deux derniers sont moins toxiques que les précédents et leur action thérapeutique est plus puissante.

Nous avons comparé à notre tour l'action pharmacodynamique de la

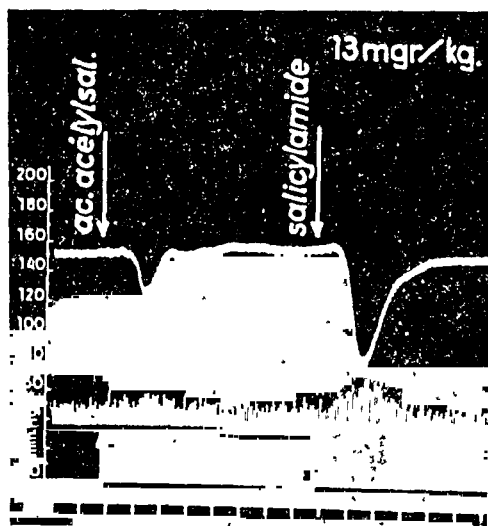


FIG. 1

2.XII.48. Chien chloralosé et atropiné de 8 kg.

De haut en bas : pression carotidienne, respiration, zéro de la pression artérielle et signal, temps (10 sec.). Successivement, injection intraveineuse de 13 mgr/kg d'acide acétylsalicylique et de salicylamide dissous dans le propylène glycol (10 %).

salicylamide, de l'acide acétylsalicylique, des O- et N-acétylsalicylamides et de la O,N-diacétylsalicylamide en les administrant au chien par voie intraveineuse.

Les acétylsalicylamides sont très peu solubles dans l'eau; le dérivé O,N-diacétylé se dissout facilement dans le propylène glycol à la concentration de 10 %. Des deux molécules mono-acétylées, la N-acétylsalicylamide est la moins soluble et on doit injecter tièdes ses solutions à 10 % dans le propylène glycol sous peine de les voir recristalliser.

Les graphiques 1 et 2 montrent l'influence des cinq produits que nous avons étudiés sur la pression artérielle et la respiration du chien anesthésié à la chloralosane et atropiné. Ils sont introduits dans la veine du chien à raison de 13 mgr par kilo de poids corporel.

La salicylamide (FIG. 1) exerce une action vasodilatatrice plus vive que l'acide acétylsalicylique, mais l'influence des deux produits sur la

respiration est qualitativement la même : une légère stimulation à laquelle la dépression circulatoire n'est certainement pas étrangère.

Les acétylsalicylamides sont hypotensives au même titre que l'acide acétylsalicylique, mais en ce qui concerne la respiration, leur action est tout à fait différente (FIG. 2). Dès l'introduction du produit dans la veine, il apparaît une stimulation respiratoire soudaine et de courte

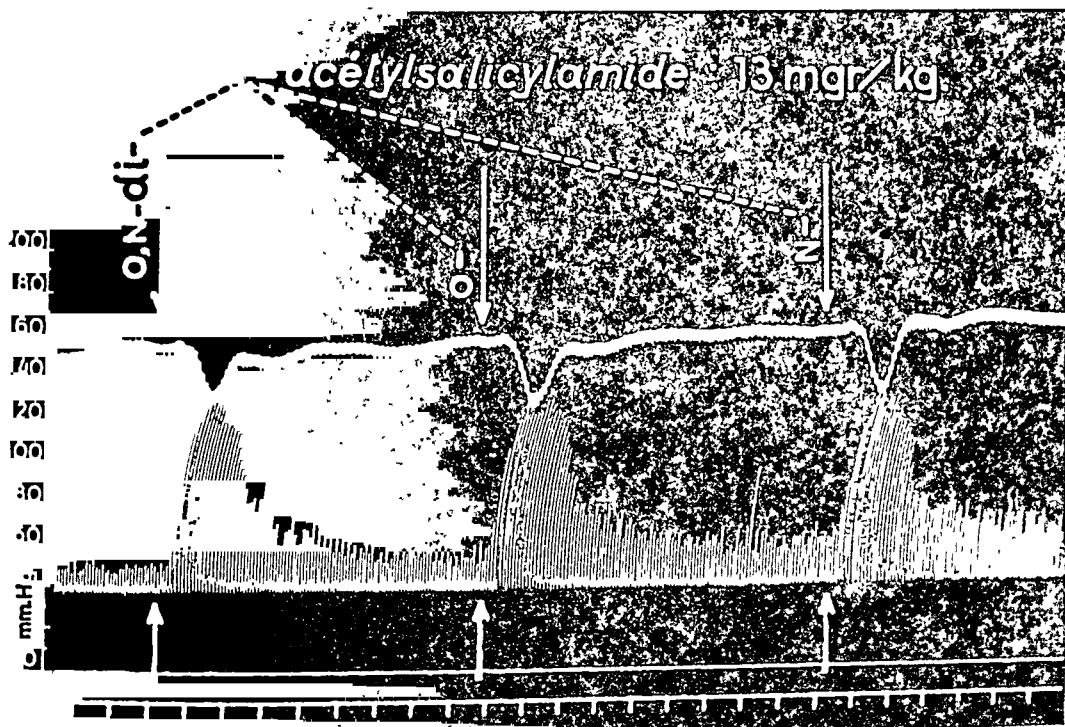


FIG. 2

Même sujet. Successivement, injection intraveineuse de 13 mgr/kg de O,N-diacétylsalicylamide, de O-acétylsalicylamide et de N-acétylsalicylamide dissous dans le propylène glycol (10 %).

durée. Ces deux caractères nous ont fait penser qu'il s'agissait d'une excitation des éléments chémosensibles du sinus carotidien. Nous avons cherché à nous assurer du bien-fondé de cette hypothèse et nous avons constaté que cette stimulation respiratoire (FIG. 3a) était pratiquement abolie par l'énervation bilatérale des sinus carotidiens (FIG. 3b). La faible accélération des mouvements thoraciques persistant après cette intervention disparaît d'ailleurs après section des vagues (FIG. 3c).

Nous pouvons résumer comme suit les quelques précisions supplémentaires que notre étude pharmacodynamique nous a permis de noter :

- 1) Les trois dérivés, mono-acétylés ou di-acétylé de la salicylamide

exercent le même pouvoir excitant respiratoire qualitativement et quantitativement.

2) Chez certains sujets, on observe une bradycardie transitoire se manifestant dès l'injection intraveineuse des acétylsalicylamides. Cette bradycardie n'apparaît pas si les animaux ont été préalablement atropinés.

3) L'hypotension contemporaine de la stimulation respiratoire est

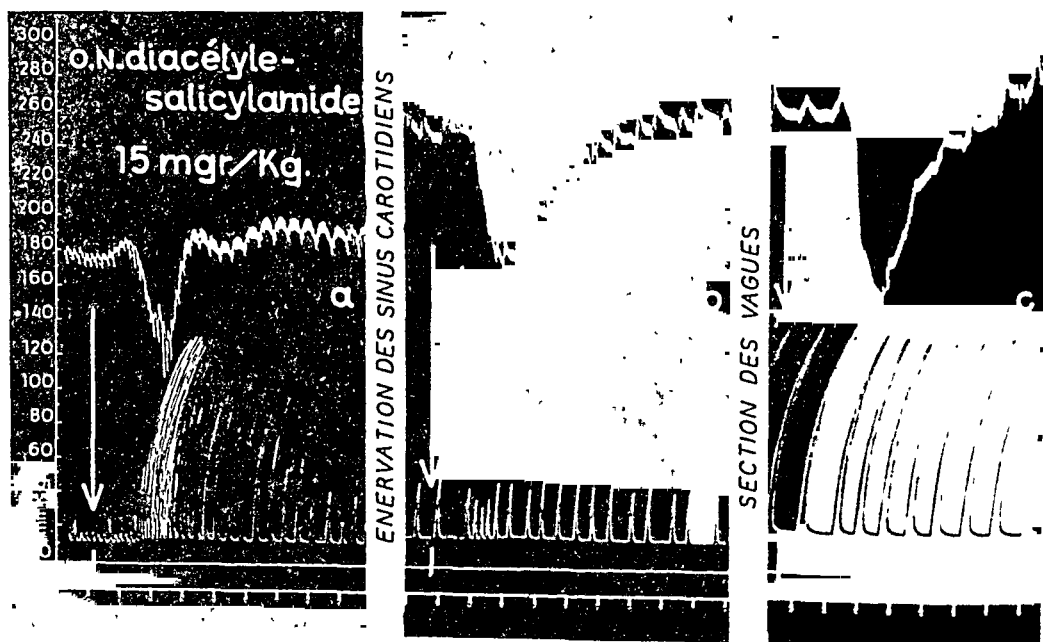


FIG. 3

30.XII.48. Chien chloralosé de 13.5 kg.

De haut en bas, pression carotidienne, respiration, zéro de la pression artérielle et signal, temps (10 sec.).

En a : injection intraveineuse de 15 mgr/kg de O,N-diacétylsalicylamide.

En b : même dose du produit chez le chien dont les sinus carotidiens sont éternés.

En c : même dose du produit chez le chien dont les vagues sont en outre sectionnés.

partiellement due au solvant utilisé pour dissoudre et injecter les acétylsalicylamides, le propylène glycol.

4) Cette hypotension peut être corrigée en partie en injectant en même temps que les acétylsalicylamides une dose normale d'éphédrine (0.5 mgr d'éphédrine pour 20 mgr d'acétylsalicylamide dissous dans 1 cc de propylène glycol par kilo de poids corporel).

5) Chez certains sujets, surtout pour les dérivés mono-acétylés, cette hypotension peut faire place à une hypertension.

6) L'administration de l'association d'acétylsalicylamide et d'éphédrine exerce un effet très favorable sur le sujet dont la respiration est déprimée par une dose adéquate de barbiturate ou de morphine.

7) Quoique la forte stimulation respiratoire soit passagère, elle provoque très souvent une amélioration plus persistante de la respiration. Comme on le voit à la figure 2, la respiration, après chaque période de stimulation aiguë, augmente graduellement d'amplitude; le surventilation permet, en effet, pendant quelques instants, une oxygénation plus abondante des centres qui rend ceux-ci dans la suite plus aptes à répondre aux excitations physiologiques.

8) Les acétylsalicylamides ne semblent pas rendre la fibre musculaire lisse plus sensible à l'adrénaline.

9) L'introduction dans la veine du chien de 5 mgr d'acétylsalicylamide par kilo provoque une stimulation respiratoire très faible; celle-ci s'intensifie en même temps que la dose grandit, mais l'hypotension en devient d'autant plus manifeste.

10) L'hypotension ne possède aucun caractère muscarinique.

Nous nous sommes demandé si la propriété d'exciter la respiration par voie réflexe est un caractère général des amides acétylées. Il ne semble pas en être ainsi, car la diacétylurée et l'acétylthiourée n'exercent pas cette action.

Par contre, l'acétylbenzamide accuse un pouvoir excitant léger, bien inférieur à celui de l'acétylsalicylamide, et la benzoïlsalicylamide agit beaucoup plus activement que cette dernière (1). Nous cherchons à déterminer actuellement si la qualité cyclique de l'amide est bien indispensable à la propriété excitante et quels sont les radicaux estérifiants les plus favorables à développer cette action.

Les nombreuses substances auxquelles les éléments chémosensibles du sinus carotidien répondent provoquent d'habitude simultanément hypertension, bradycardie et surventilation: les acétylsalicylamides déclenchent généralement cette dernière en même temps qu'une hypotension: à notre avis, cette chute de la pression artérielle se produisant par action des dérivés sur la fibre musculaire lisse masque chez la plupart des chiens une certaine tendance hypertensive. Celle-ci apparaît beaucoup plus clairement pour la benzoïlsalicylamide.

Nous ne pourrions d'ailleurs mieux comparer l'action stimulante respiratoire des acétylsalicylamides qu'à celle de la lobéline dont la structure chimique est cependant bien différente. Plus proche au point de vue structure, nous trouvons la coramine, dérivé de la pyridine, souvent utilisée comme analeptique respiratoire, mais dont le mode

(1) Les dérivés de la salicylamide et de la benzamide dont il est question dans ce travail ont été synthétisés par H. LE BIHAN et P. RAYET au Laboratoire de Recherches de la Société Belge de l'Azote et des Produits chimiques du Marly.

d'action a été démontré récemment comme étant tout différent de celui des acétylsalicylamides, puisqu'il est central (HENDERSON et YI, 1943).

En conclusion : l'O-acétylsalicylamide, la N-acétylsalicylamide et la O,N-diacétylsalicylamide provoquent toutes trois une stimulation respiratoire dont le point de départ se trouve dans les éléments chémosen-sibles du sinus carotidien. Comme action secondaire, ces trois dérivés déterminent une hypotension somatique par action dépressive sur la fibre musculaire lisse.

BIBLIOGRAPHIE

- ANSELMINO, K. J. *Arch. ges. Physiol.*, 1928, 220, 633.
BAAS, H. K. *Ztsch. physiol. Chem.*, 1890, 14, 431.
BONDZYNSKI, ST. *Arch. exp. Path. u. Pharmacol.*, 1897, 38, 98.
COLLETT, M. E. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1923, 20, 259.
HART, E. R. *J. Pharmacol.*, 1947, 89, 205.
HENDERSON, V. E. et YI, C. L. *J. Pharmacol.*, 1943, 79, 235.
HOUBEN, J. *Fortschritte der Heilstoffchemie*, Abt. II, Vol. 2, p. 562.
ICHNIOWSKI, C. T. et HUEPER, W. C. *J. A. Ph. A.*, 1946, 35, 225.
KITANO, T. *Arch. exp. Path. u. Pharmacol.*, 1927, 127, 69.
NEBELTHAU, E. *Arch. exp. Path. u. Pharmacol.*, 1895, 36, 451.
WILLIAMS, R. T. *Detoxication mechanisms*, Chapman et Hall, London, 1947.

ISTITUTO DI PATOLOGIA SPECIALE MEDICA E METODOLOGIA CLINICA
DELL'UNIVERSITA DI MILANO. DIRETTORE : PROF. L. VILLA

INFLUENZA DEL PARATORMONE E DELLA VITAMINA D₂ SULL'ATTIVITÀ FOSFATASICA DEL RENE DI RATTO

(With Summary)

DI

M. BONELLI E G. SALA

(Manoscritto ricevuto il 28-3-1949).

L'azione del paratormone e della vitamina D₂ sul ricambio fosfocalcico é complessa e coinvolge parecchi organi e funzioni.

Negli ultimi anni ALBRIGHT e ELLSWORTH (1) e GOADBY e STACEY (2) hanno dimostrato che l'azione primitiva del paratormone si esercita nella regolazione del metabolismo del fosforo e non nella regolazione di quello del calcio; successive ricerche di TWEEDY e collaboratori (3), NEUFELD e COLLIP (4), SELYE (5), COHN, COHN e AUB (6), ALBRIGHT (7) precisarono sempre meglio questo concetto attribuendo al paratormone un'azione iperfosfaturica, confermata anche dalle più recenti ricerche di TWEEDY e CAMPBELL (8) e TWEEDY e Collaboratori (9) eseguite con l'impiego del fosforo radioattivo, attraverso un meccanismo renale diretto: l'aumento della fosfaturia, che avverrebbe secondo HARRISON e HARRISON (10) per una diminuzione del riassorbimento tubulare dei fosfati, provocherebbe ipofosforemia, conseguente mobilitazione compensatoria dei fosfati calcici dell'osso e contemporanea ipercalcemia, poiché si mantiene invariata la soglia renale per il calcio.

All'azione renale diretta del paratormone fanno però obiezioni GUNNAR (11) e FAY, BEHRMAN, BUCK (12).

Alla vitamina D₂, oltre la nota azione sull'assorbimento intestinale del calcio, e sull'osso, TWEEDY (13), CAMERON (14), HARRISON (10) attribuiscono anche un'azione renale diretta, consistente in diminuzione della fosfaturia con iperfosforemia, per aumentato riassorbimento tubulare dei fosfati. Dati in contrasto sono invece forniti da CLEMENS (15).

In base a queste acquisizioni, in parte cliniche ed in parte sperimentali, che prospettano sotto nuova luce il meccanismo di azione farmacologica del paratormone e della vitamina D_2 , abbiamo voluto indagare il comportamento delle fosfatasi alcalina ed acida del tessuto renale del ratto dopo somministrazione di paratormone e di vitamina D_2 , seguendo l'ipotesi di lavoro che alle surriferite modificazioni della fosfaturia provocate da queste due sostanze, potessero corrispondere modificazioni dell'attività delle fosfatasi del tessuto renale, per cercare così di far luce sui rapporti tra fosfatasi del rene e funzione renale di eliminazione dei fosfati.

TECNICA SPERIMENTALE

Furono usati ratti bianchi adulti di entrambi i sessi, del peso variante da g. 150 a g. 240, tenuti a dieta equilibrata normale, lasciati nutrire ad libitum nel corso delle esperienze.

6 ratti furono tenuti come controlli.

14 ratti furono iniettati s. c. con 20 U. I. di Paratormone Lilly e sacrificati a varia distanza di tempo.

5 ratti furono iniettati s. c. con 10 mg. di vitamina D_2 Glaxo, e uccisi a varia distanza di tempo.

Gli animali vennero sacrificati per dissanguamento.

Gli estratti d'organo furono preparati: secondo il metodo di KAY (16), con autolisi di 24 ore, per il rene e fegato; secondo la tecnica proposta da MARTLAND e ROBISON (17), con autolisi di 8 giorni, per l'osso.

Il potere fosfatasico fu determinato secondo il metodo di BODANSKY (18).

Nella determinazione della fosfatasi acida fu usato un tampone a pH 5 formato con acido acetico ed acetato di sodio; per la fosfatasi alcalina usato un tampone al veronal a pH 8.6.

Gli animali furono tutti uccisi con la tecnica prima esposta; nessuno morì per fatti tossici, e neppure mostrò segni di intossicazione.

RISULTATI

Nella tavola 1 sono riferiti i dati riguardanti le fosfatasi alcaline e acide del rene, fegato e osso, riferiti sia all'unità di peso che al peso totale dell'organo, degli animali controllo e di quelli iniettati. Nella colonna tempo sono segnate le ore trascorse tra l'iniezione e la morte degli animali.

La figura 1 mostra le variazioni percentuali della fosfatasi alcalina del rene riferite a 1 g di tessuto fresco, dopo trattamento con paratormone e con vitamina D_2 , rispetto ai controlli: ognuno dei dati segnati nel diagramma rappresenta la media dei valori ottenuti da due animali, salvo quelli della 5^o, 7^o, 48^o ora nell'esperienza con paratormone, e

TAVOLA I

Risultati sperimentali

Ratto	Sesso	Peso g	Trattamento	Tempo ore	Fosfatasi in unità Bodansky						Valori medi fosfatasi alcaline del rene per g. di tessuto
					Rene		Fegato		Osso		
					alcalina	acida	alalina	acida	alcalina	per g	
1	m.	200	controllo		13.34	26.54	1.10	0.49	0.63	3.11	17.86 ± 1.32 °
2	m.	210	"		16.60	40.95	1.32	1.64	1.60	1.56	
3	m.	150	"		19.80	28.41	0.35	1.25	0.26	1.62	
4	m.	190	"		21.26	44.21	1.51	0.67	1.94	2.70	
5	f.	160	"		20.74	33.39	0.42	0.36	0.53	3.43	28.62 ± 1.40 °
6	m.	180	"		15.40	31.71	1.78	0.59	2.68	—	
7	m.	240	paratormone	3	15.83	34.66	1.73	—	1.60	1.60	
8	m.	200	"	3	18.02	34.59	1.85	1.40	2.04	2.25	
9	f.	200	"	5	29.34	55.15	0.36	0.46	0.34	—	11.87 ± 0.182 °
10	m.	210	"	6	28.42	64.51	0.65	0.51	0.91	1.90	
11	m.	230	"	6	33.31	63.78	0.48	0.52	0.26	3.12	
12	f.	160	"	6	24.82	34.47	2.48	1.03	2.30	—	
13	f.	150	"	7	27.20	47.60	2.48	0.64	1.97	—	11.87 ± 0.182 °
14	m.	240	"	9	22.87	56.71	0.92	2.36	1.02	2.65	
15	m.	210	"	9	21.02	41.65	2.13	1.14	1.30	2.29	
16	m.	205	"	12	22.76	40.28	1.84	1.48	2.56	3.37	
17	m.	210	"	12	21.64	38.34	0.43	1.06	0.34	2.73	11.87 ± 0.182 °
18	m.	220	"	24	15.82	28.47	0.61	0.16	0.17	3.46	
19	m.	200	"	24	16.26	38.37	0.99	0.80	2.14	2.55	
20	f.	160	"	48	18.14	26.84	1.24	0.21	1.41	4.23	
21	m.	200	Vitamina D ₂	6	19.45	36.35	1.43	0.95	1.00	—	11.87 ± 0.182 °
22	f.	150	"	24	11.73	19.70	1.44	0.10	1.88	0.86	
23	m.	170	"	24	11.53	22.25	1.44	0.39	1.94	1.61	
24	m.	200	"	24	12.38	20.79	2.28	0.95	1.59	—	
25	m	210	"	48	11.83	22.83	1.76	1.29	1.77	—	

" errore standard. m. maschio. f. femmina.

inorganici circolanti che vengono poi eliminati dal rene attraverso un meccanismo a tipo di soglia.

Le elettive modificazioni di attività della fosfatasi alcalina del rene da noi dimostrate sembrerebbero contraddire la seconda delle due ipotesi; é d'altra parte per ora impossibile rendersi ragione dei rapporti fra attività fosfatasica renale e funzione renale di eliminazione dei fosfati, che oggi sappiamo implicare certamente un meccanismo di riassorbimento tubulare.

RIASSUNTO

L'iniezione s. c. di 20 U. I. di Paratormone provoca nel ratto un significativo ed elettivo aumento della fosfatasi alcalina del rene.

L'iniezione s. c. di 10 mg di vitamina D₂ provoca nel ratto una significativa ed elettiva diminuzione della fosfatasi alcalina del rene.

Queste modificazioni elettive appoggiano l'idea di un'azione renale delle due sostanze iniettate.

SUMMARY

The alkaline phosphatase of rat kidney increases after a single subcutaneous dose of 20 I. U. of Lilly Parathormone; on the contrary a decrease of rat kidney alkaline phosphatase was observed after a single subcutaneous dose of 10 mg of Glaxo vitamine D₂.

These elective and statistically significant modifications support the hypothesis of a direct action on the kidney of parathormone and vitamine D₂.

BIBLIOGRAFIA

1. — ALBRIGHT, F., ELLSWORTH, R. *Journ. of Clinic. Investig.*, 1929, 7, 183.
2. — GOADBY, H. K. e STACEY, R. S. *Biochem. Journ.*, 1934, 28, 2093.
3. — TWEEDY, W. R. e coll., *Endocrinology*, 1937, 21, 55.
4. — NEUFELD, A. H. e COLLIP, J. B. *Endocrinology*, 1942, 30, 135.
5. — SELYE, H. *Arch. of Pathology*, 1942, 34, 625.
6. — COHN, W. E., COHN, E. T. e AUB, J. C. *Annual Rew. of Biochem.*, 1942, 11, 415.
7. — ALBRIGHT, F. *J. A. M. A.*, 1941, 117, 527.
8. — TWEEDY, W. R. e CAMPBELL, W. W. *Journ. of Biol. Chem.*, 1944, 154, 339.

9. — TWEDDY, W. R. e coll. *Journ. of Biol. Chem.*, 1947, 168, 597.
10. — HARRISON, H. E. e HARRISON, H. C. *Journ. Clin. Investig.*, 1941, 20, 47.
11. — GUNNAR. *Biological Abstracts*, 1946, 20, 1346.
12. — FAY, M., BEHRMAN, V. G. e BUCK, D. M. *Am. Journ. of Physiology*, 1942, 136, 716.
13. — TWEDDY, W. R. *Journ. of Biol. Chem.*, 1939, 128, 407.
14. — CAMERON, A. T. La moderna endocrinologia, Utet 1947, Torino.
15. — CLEMENS, P. *Compt. r. Soc. de Biol.*, 1939, 130, 815.
16. — KAY, H. D. *Biochem. Journ.*, 1928, 22, 855.
17. — MARTLAND, H. e ROBISON, D. *Biochem. Journ.*, 1929, 23, 237.
18. — BODANSKY, H. *Journ. Biol. Chem.*, 1932, 99, 197 e 1933, 101, 93.
19. — PISA, M. *Pathologica*, 1935, 27, 10.
20. — AUSTONI, B. e COGGI, G. *Arch. Ital. Chirurgia*, 1931, 37, 313.
21. — PAGE, I. H. *Biochem. Zeit.*, 1930, 223, 222.
22. — PAGE, I. H. e RESIDE, M. *Biochem. Zeit.*, 1930, 226, 273.
23. — CRIMM, P. D. e STRAYER, J. W. *Journ. Biol. Chem.*, 1935, 112, 511.
24. — KOCHAKIAN, C. D. e DONTIGNY, P. *Proc. Soc. Exper. Med. and Biol.*, 1948, 67, 61.
25. — HEPLER, O. E., SIMONDS, J. P. e GURLEY, H. *Proc. Soc. Exper. Med. and Biol.*, 1940, 44, 221.
26. — BRAIN, R. T., KAY, H. D. e MARSHALL, P. G. *Biochem. Journ.*, 1928, 22, 628.

CLINIQUE MÉDICALE UNIVERSITAIRE DE L'HÔPITAL BRUGMANN
PROF. BASTENIE

ACTION DU CHLORHYDRATE DE DIÉTHYLAMINOÉTHYL- N-THIODIPHÉNYLAMINE SUR LE MÉTABOLISME BASAL ET LE MÉTABOLISME APRÈS EFFORT DE SUJETS HYPERTHYROIDIENS ET NORMOTHYROIDIENS

PAR

J. MAHAUX ET K. KOWALEWSKI

(Travail reçu le 4-4-1949).

I. — ACTION SUR LES COMBUSTIONS BASALES

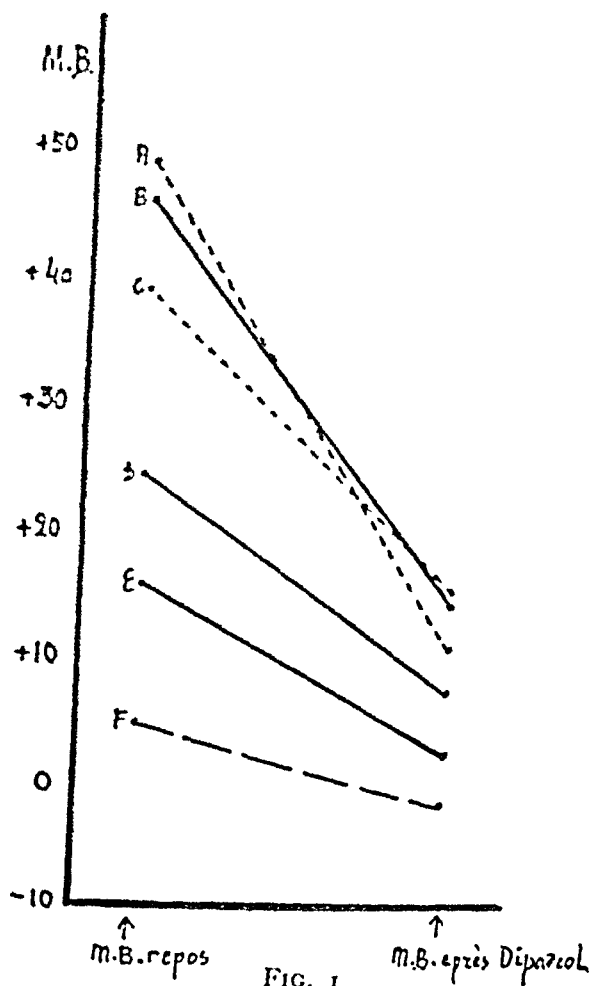
Nous avons déjà signalé dans des publications antérieures (1, 2, 3) la réduction appréciable des combustions qui fait suite à l'administration de l'ester diéthylaminoéthylque de l'acide phényl-cyclopentane-carboxylique (Parpanit) :

- 1) Chez les parkinsoniens graves à métabolisme élevé.
- 2) Chez les hyperthyroïdiens.

J. SIGWALD, D. BOVET et G. DUMONT (5) ont décrit, en 1946, les propriétés du Chlorhydrate de Diéthylaminoéthyl-N-Thiodiphénylamine (2987 R.P.), produit synthétique nouveau dont l'administration aux parkinsoniens diminue l'hypertonie, le tremblement et l'akinésie, sans modifier notablement le pouls et la tension artérielle.

Comme nous l'avons montré ailleurs, l'administration de cette substance (250 mgr) à des parkinsoniens permet d'observer, après 45 à 60 minutes, une chute appréciable de leur consommation d'oxygène. Dans une série de 6 cas de Parkinson sénile, les combustions, dont la valeur moyenne est de + 39 %, tombent à + 15,5 %. Dans un groupe de 9 cas de Parkinson postencéphalitique, les combustions passent d'une moyenne de + 49 % à + 11 %.

Il nous a paru intéressant de vérifier si cette action hypométabolique se retrouve également chez les hyperthyroïdiens. Nous avons étudié 40 hyperthyroïdiens (M. B. supérieur à $\pm 10\%$) et, à titre de témoins, 10 normothyroïdiens (M. B. de ± 10 à -10%).



Modification des combustions après administration de 250 mg de Chlorhydrate de Diéthylaminoéthyl-N-Thiodiphénylamine (Diparcol).

- A. — (.....) Chez 9 Parkinson post-encéphalitique, chute de $+49\%$ à $+11\%$
- B. — (.....) Chez 7 hyperthyroïdiens graves, chute de $+46,1\%$ à $+14,4\%$
- C. — (.....) Chez 6 Parkinson séniles, chute de $+39\%$ à $+15,5\%$
- D. — (.....) Chez 17 hyperthyroïdiens moyens, chute de $+24,5\%$ à $+7,7\%$
- E. — (.....) Chez 16 hyperthyroïdiens légers, chute de $+15,9\%$ à $+2,5\%$
- F. — (-----) Chez 10 sujets normaux, chute de $+4,9$ à $-1,4\%$.

On constate que l'effet observé chez les hyperthyroïdiens est superposable à celui obtenu chez les parkinsoniens. Cet effet est d'autant plus marqué que les combustions initiales sont plus élevées.

1) Action chez les hyperthyroïdiens.

Nous avons séparé des états d'hypermétabolisme élevé (M. B. supérieur à $+40\%$), des cas moyens (M. B. de $+20\%$ à $+40\%$) et des cas légers (M. B. de $+10\%$ à $+20\%$) (FIG. 1). Dans les états d'hyper-

métabolisme élevé (7 cas), les combustions tombent en moyenne de + 46,1 à + 14,4 %, soit une différence (Δ) de 31,7 %.

Dans les cas moyens (17 cas), elles tombent de + 24,5 % à 7,7 %, soit une différence (Δ) de 16,8 %.

Dans les cas légers (16 cas), elles tombent de 15,9 % à + 2,5 %, soit une différence (Δ) de 13,4 %.

2) *Action chez les normothyroïdiens.*

Chez 10 sujets à combustions basales normales (M. B. 0 à + 10 %), le métabolisme s'abaisse en moyenne de + 4,9 % à - 1,4 %, soit une différence (Δ) de 6,3 %. L'épreuve n'a pas été appliquée à des hypothyroïdiens.

En résumé : La réduction des combustions par le Chlorhydrate de Diéthylaminoéthyl-N-thiodiphénylamine, marquée dans les états d'hypermétabolisme élevé (Δ : 31,7 %), l'est moins dans les cas moyens (Δ : 16,8 %) et les cas légers (Δ : 13,4 %). L'action hypométabolique est d'autant plus efficace qu'elle s'exerce sur des processus plus actifs (FIG. 1). L'emploi du Parpanit nous avait déjà fait faire la même constatation.

II. — ACTION SUR LES COMBUSTIONS APRÈS EFFORT

Comme dans l'étude consacrée au Parpanit, nous avons mesuré :

- 1) Les combustions basales.
- 2) Les combustions après 3 minutes de mouvements rythmiques des bras. Le patient absorbe ensuite 250 mg. de Chlorhydrate de Diéthylaminoéthyl-N-thiodiphénylamine et se repose pendant 45 minutes. A ce moment, on effectue.
- 3) Une nouvelle mesure des combustions de repos.
- 4) Une nouvelle mesure des combustions après effort.

Cette épreuve a été appliquée à 10 sujets à métabolisme basal supérieur à + 10 %. Le tableau et le graphique ci-contre réunissent les résultats obtenus (TABLEAU I, FIG. 2). On constate que la première épreuve d'effort élève les combustions d'une valeur moyenne de + 29 % à + 51,8 %, soit une flèche (F1) de 22,8 %. Le Chlorhydrate de Diéthyl-

aminoéthyl-N-thiodiphénylamine abaisse les combustions à $+ 15,1 \%$ ($\Delta : 13,9 \%$). La seconde épreuve d'effort ne donne plus qu'une flèche métabolique (F2) de $8,2 \%$. Comme après Parpanit, on constate une réduction appréciable de la flèche hypermétabolique d'effort.

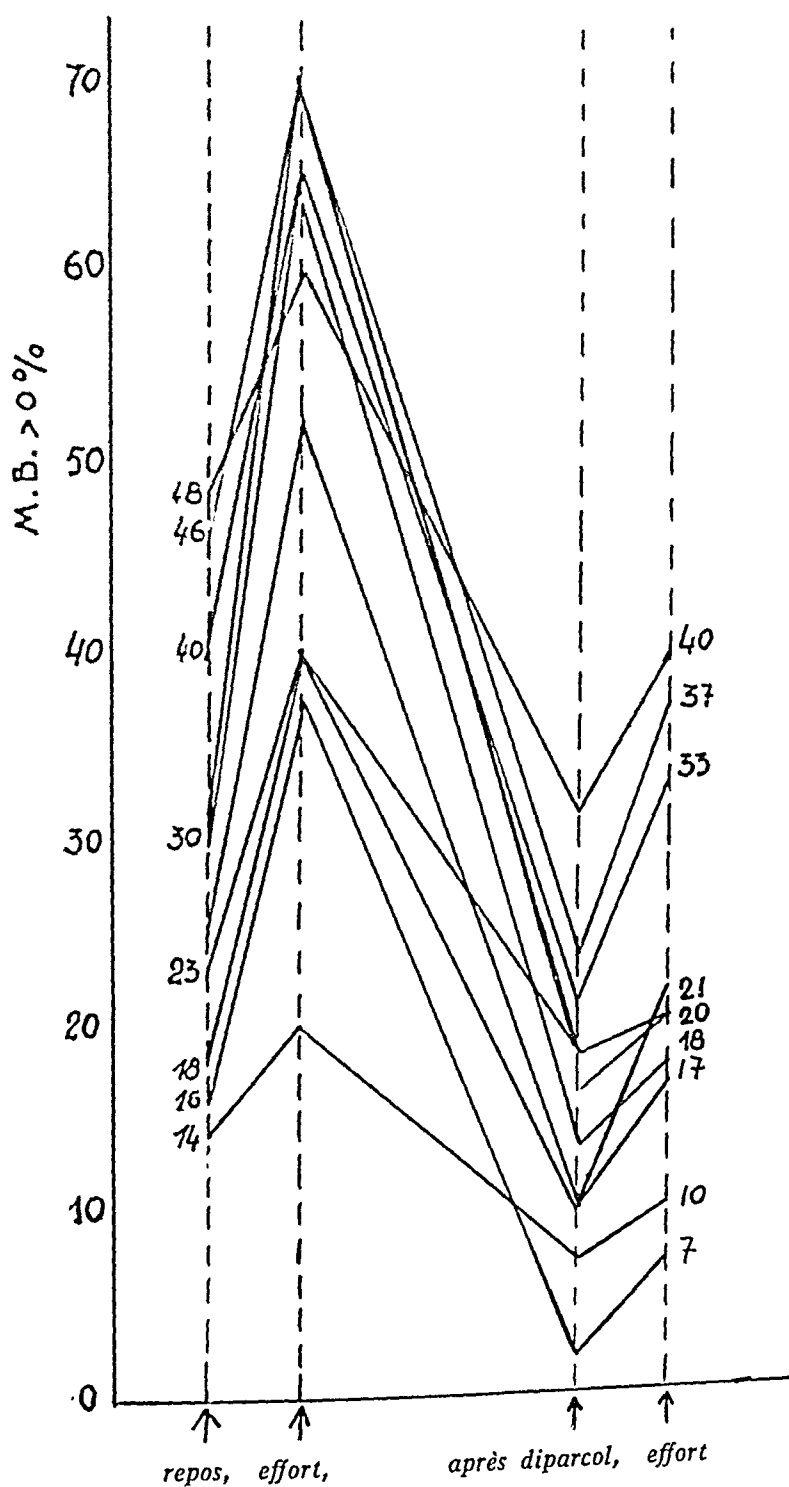


FIG. 2

Action du Diparcol sur les combustions après effort.

TABLEAU I

N°	Nom	Sexe	Age	Poids	Taille	MB %	M. effort	M. diparcol	M. diparcol + effort
1	B.M.	♀	55	51	1,64	+ 48	+ 60	+ 31	+ 40
2	M.D.	♀	41	49	1,60	+ 48	+ 70	+ 18	+ 20
3	D.B.	♀	49	46	1,53	+ 40	+ 63	+ 13	+ 18
4	D.M.	♀	28	47	1,57	+ 30	+ 71	+ 23	+ 37
5	M.M.	♀	25	54	1,54	+ 30	+ 65	+ 21	+ 33
6	V.M.	♀	33	53	1,55	+ 25	+ 52	+ 10	+ 17
7	H.M.	♀	68	47	1,54	+ 23	+ 40	+ 10	+ 21
8	D.B.	♀	28	46	1,55	+ 18	+ 40	+ 16	+ 20
9	M.B.	♀	44	56	1,76	+ 16	+ 37	+ 2	+ 7
10	C.M.	♀	52	61	1,53	+ 14	+ 20	+ 7	+ 10
Moyennes						+ 29 F. = 22,8	+ 51,8	+ 15,1 F. = 8,2	+ 23,3

CONCLUSIONS

L'effet pharmacodynamique du Chlorhydrate de Diéthylaminoéthyl-N-thiodiphénylamine sur les combustions des hyperthyroïdiens se révèle superposable à celui de l'ester diéthylaminoéthylique de l'acide phényl-cyclopentane-carboxylique.

Il semble que l'hyperthyroïdie entraîne une excitation anormalement élevée des centres nerveux supérieurs activateurs des mécanismes thermogénétiques, musculaires et autres, et que la médication réalise une réduction de cette hyperthermogénèse. Cette conception nous paraît compatible avec l'analyse mathématique de l'effet hypermétabolique de la thyroxine par I. M. RABINOWITCH (4), laquelle suggère qu'un des facteurs de l'élévation des combustions est l'augmentation de la masse de protoplasme actif.

BIBLIOGRAPHIE

1. — J. MAHAUX et K. KOWALEWSKI. Étude de l'influence de l'ester diéthylamino-éthylique de l'acide phényl cyclopentane carboxylique (Parpanit) sur l'élévation des combustions des Parkinsoniens. *Schweiz. Med. Wschr.*, n° 41, 16 oct. 1948, 78^{me} année, 1013-1014.

2. — J. MAHAUX et K. KOWALEWSKI. Action de l'ester diéthylamino-éthylique de l'acide phénylcyclopentanecarboxylique (Parpanit) sur le métabolisme basal et le métabolisme après effort de sujets hyperthyroïdiens, hypothyroïdiens et normothyroïdiens. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1948, LXXVII, n° 3, 289-299.
3. — J. MAHAUX et K. KOWALEWSKI. Influence de l'ester diéthylaminoéthylique de l'acide phénylcyclopentane carboxylique et du chlorhydrate de diéthylaminoéthyl-N-thiodiphénylamine sur les combustions des parkinsoniens. *Acta Neurologica et Psychiatrica* (*J. belge de Neurologie et de Psychiatrie*), 1949, (sous presse).
4. — I. M. RABINOWITCH. On the Action of Thyroxin. *J. of Biological Chemistry*, 1924, 62, 245-258.
5. — J. SIGWALD, D. BOVER et G. DUMONT. Le traitement de la maladie de Parkinson par le Chlorhydrate de Diéthylaminoéthyl-N-Thiodiphénylamine (2987 R.P.). *Revue Neurologique*, 78, n° 11-12, 1946.

BIOCHEMICAL LABORATORY, BIOCHEMICAL CENTRE, UNIVERSITY OF GHENT
(BELGIUM)

PALUDRINE AND CATION EXCHANGE

BY

L. MASSART

(Received for publication 7-4-1949).

It has been proved that different basic dyes such as trypaflavine and methylene blue cause a progressive inhibition of the respiration of bakers' yeast (1). Protamine has the same effect (2). Other basic organic compounds such as spermine and streptomycine do not interfere with the respiration of baker's yeast (3).

We have shown that the inhibition of the respiration of bakers' yeast caused by trypaflavine can be reversed by non toxic metallic cations and by non toxic basic compounds (4). The reversion by metallic cations is governed by the valence of the reversing cation. This means that we are dealing with an exchange of cations.

This paper is devoted to the activity of another basic compound, the well known anti-malarial paludrine.

From our experimental results it appears that paludrine causes a progressive inhibition of the respiration of bakers' yeast and that this inhibition is reversed by metallic cations (MgSO_4 has been employed) and by non toxic basic organic compounds (spermine and streptomycine) just like it is the case for trypaflavine and other basic dyes.

Experimental Part.

All our experiments were made with the Warburg apparatus. The temperature was always 30° C. The cups contained 2 ml of fluid : 1 ml of a 1 % suspension of bakers' yeast in KH_2PO_4 M/20, 0,1 ml of glucose 10 % and 0,9 ml of water or resp. inhibitor or inhibitor + reverser. The results are expressed in μl oxygen per hour.

Fresh suspensions of yeast were always used and this explains the differences in the uptake of oxygen for different experiments. Paludrine has been used as the hydrochloride.

I. — *Reversion of the inhibition by spermine*

Paludrine has been used at a final concentration of M/500; the final concentration of spermine is given in the tables; it has been used as the tetrahydrochloride.

Without paludrine; without spermine.	With paludrine; without spermine.	With paludrine; with spermine at the conc. indicated below.	
254	145	$5.10^{-3}M$	247
279	147	$5.10^{-3}M$	277
284	175	$2.10^{-3}M$	278
284	175	$1.10^{-3}M$	283

II. — *Reversion of the inhibition by streptomycine*

Paludrine has been used at a final concentration of M/500; the final concentration of streptomycine was 1.10^{-2} ; streptomycine hydrochloride Squibb was used in the experiments.

Without paludrine; without streptomycine.	With paludrine; without streptomycine.	With paludrine; with streptomycine.
281	180	212
245	151	195

III. — *Reversion of the inhibition by Mg-ions*

Paludrine has been used at a final concentration of M/500; the final concentrate of magnesium sulfate was $1.10^{-2}M$.

Without paludrine; without Mg^{++} .	With paludrine; without Mg^{++} .	With paludrine; with Mg^{++} .
261	148	249
257	151	256

DISCUSSION

From our experiments it results, that the inhibition of the respiration of bakers' yeast, caused by the basic compound paludrine, is reversed by Mg-ions and by the non inhibiting (in so far as respiration is concerned) basic compounds spermine and streptomycine. It should however be said that streptomycine is a poor reverser.

These results widen our earlier experiments concerning the inhibition by basic dyes and more especially by tryptaflavine and methylene blue (4). Our hypothesis that a cation exchange takes place between the inhibiting compounds and ions of the yeast cell therefor grows in importance. The basic compounds are bound by cation exchange and this is the first step in the mechanism of their activity. We have proved before that the nucleic acids of the yeast cell are excellent cation exchangers (5).

Two points remain to be explained. The first one is, why tryptaflavine f. i. is toxic and spermine not. We have no definite answer to this question. The second point is that one asks why growth is stopped before respiration. It should be said that nucleic acids are concerned as well with growth as with respiration. The first of these facts is no more to be proved, the second appears from experiments of Chantrenne (6), who has shown that important respiratory enzymes are bound to the larger "micro-organites" of the yeast cell and that these micro-organites contain also ribonucleic acid. It might be suggested that the different "micro-organites" do not bind basic compounds with the same ease and that in this way a differentiation between growth and respiration takes place.

SUMMARY

Paludrine exerts a progressive inhibition upon the respiration of bakers' yeast. This inhibition is reversed by Mg-ions, by spermine and streptomycine. It is suggested that paludrine is bound by cation exchange.

RÉSUMÉ

La paludrine provoque une inhibition progressive de la respiration des levures de boulangerie. Cette inhibition disparaît en présence d'ions Mg, de spermine et partiellement en présence de streptomycine (à la concentration expérimentale utilisée). Il est suggéré que les cations

des composés organiques basiques sont fixées par la cellule par un phénomène d'échange de cations. Les acides nucléiques sont des excellents échangeurs de cations.

We are most grateful to the « Amsterdamse Chininefabriek » Amsterdam, for a gift of paludrine and to Hofmann-Laroche (Basle) for a gift of spermine.

BIBLIOGRAPHY

1. — J. DE LEY, G. PEETERS and L. MASSART. *Biochim et Biophys. Acta*, 1947, *I*, 393.
2. — L. MASSART and P. VAN DEN DAELE. *Arch. int. Pharmac. Thér.*, 1948, *76*, 424.
3. — L. MASSART. *Arch. int. Pharmac. Thér.*, 1948, *77*, 88.
4. — L. MASSART, G. PEETERS and J. WUYTS-ROBIETTE. *Arch. int. Pharmac. Thér.*, 1947, *75*, 162.
5. — L. MASSART, G. PEETERS and A. VAN HOUCKE. *Arch. int. Pharmacod. Thér.*, 1947, *75*, 210.
6. — H. CHANTRENNE. *Enzymologia*, 1943-45, *II*, 213.

INSTITUT J. F. HEYMANS DE PHARMACODYNAMIE ET DE THÉRAPIE
DE L'UNIVERSITÉ DE GAND
DIRECTEUR : PROF. DR C. HEYMANS

SUR LA PHARMACOLOGIE DU
LAURYL-DIMÉTHYLAMINO-ACÉTOXY-ÉTHANE (757 L) ET
DU LAURYL-DIMÉTHYLAMINO-DIOXY-PROPANE (765 L)

(With Summary)

PAR

G. VAN DEN HEUVEL

(Travail reçu le 9-4-1949).

Différents nouveaux dérivés de l'ammonium quaternaire ont été synthétisés par LE BIHAN, URBAIN et RAYET (1). Les propriétés pharmacologiques de certains de ces composés ont été étudiées par DALLEMAGNE et PHILIPPOT (2) et nous-mêmes (3).

Dans le présent travail nous avons étudié le chlorure de lauryl-diméthylamino-2-acétoxy-1-éthane (757 L) et le chlorure de lauryl-diméthylamino-3-dioxy-1-2-propane (765 L.) (1).

1) *Lauryl-diméthylamino-acétoxy-éthane* (757 L).

Dans des publications antérieures, DALLEMAGNE et PHILIPPOT (2) et VAN DEN HEUVEL (3) ont déjà décrit certaines propriétés pharmacologiques du 757 L (2) et du lauryl-diméthyl-amino-éthanol (764 L) (3). Ces auteurs ont montré que ces deux composés possèdent des propriétés paralysantes synaptiques (actions synaptolytiques) et curarisantes.

Nous nous sommes proposés de préciser quelques propriétés du 757 L., particulièrement en ce qui concerne ses actions synaptolytiques et curarisantes.

Ces expériences ont été effectuées chez le chien.

(1) Ces composés ont été aimablement mis à notre disposition par les laboratoires de recherches pharmaceutiques de la Soc. Belge de l'Azote et des Produits Chimiques du Marly.

Voici les détails d'une expérience :

Chien, 22 kg; anesthésié à la morphine-chloralosane. Les nerfs vagues cervicaux sont sectionnés, afin d'éliminer l'innervation pressosensible cardio-aortique. Respiration artificielle. On enregistre la pression artérielle et la respiration. L'hypotension au niveau des sinus carotidiens, déterminée par l'occlusion des deux carotides communes, provoque une hypertension artérielle réflexe ($\uparrow 1$, fig. 1).

La désocclusion des carotides communes ($\uparrow 2$, fig. 1) ramène la pression artérielle à son niveau normal.

L'excitation électrique du bout central du nerf vague déclenche une hypertension artérielle réflexe ($3 \uparrow - 4 \uparrow$, fig. 1).

L'excitation électrique du bout cardiaque du nerf vague provoque un arrêt du cœur (fig. 1, $\uparrow 5$).

L'injection intraveineuse, entre II et III, fig. 1, de 1 mg/kg de 757 L détermine une légère chute de la pression artérielle et déprime ($\uparrow 6 - \uparrow 7$, fig. 1) les réflexes vasomoteurs sino-carotidiens et l'hypertension réflexe déclenchée par l'excitation du bout central du nerf vague ($\uparrow 8 - \uparrow 9$, fig. 1). La bradycardie provoquée par l'excitation du nerf vague cardiaque ($\uparrow 10 - \uparrow 11$, fig. 1) est notablement plus faible.

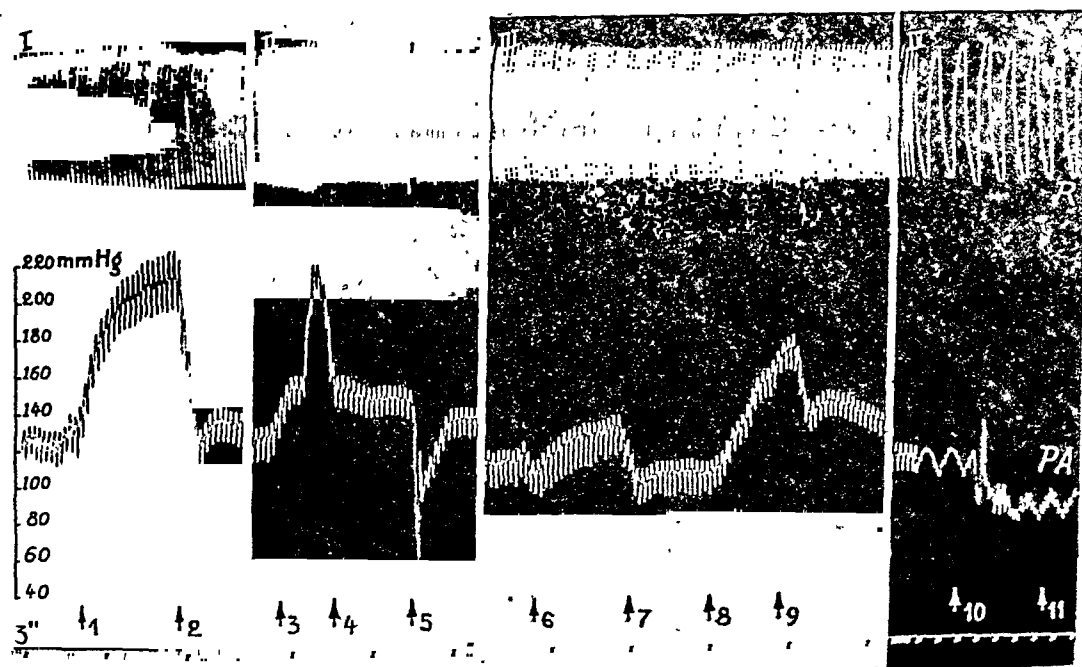


FIG. 1

Chien, 22 kg : anesthésié à la morphine-chloralosane. Les nerfs vagues sont sectionnés. De haut en bas : pneumogramme de la respiration artificielle (R). Pression artérielle et fréquence cardiaque (P.A.). Temps : 3 sec.

$\uparrow 1 - \uparrow 2$: occlusion et désocclusion des carotides communes.

$\uparrow 3 - \uparrow 4$: excitation du bout central du nerf vague.

$\uparrow 5$: excitation du nerf vague cardiaque.

Entre II et III : injection intraveineuse de 1 mg/kg 757 L.

$\uparrow 6 - \uparrow 7$: occlusion et désocclusion des carotides communes.

$\uparrow 8 - \uparrow 9$: excitation du bout central du nerf vague.

$\uparrow 10 - \uparrow 11$: excitation du nerf vague cardiaque.

Cette dose de 1 mg/kg de 757 L a donc déprimé la conduction synaptique de l'innervation vagale et sympathique.

Cette dépression au niveau des synapses vasomoteurs est passagère. Les réflexes vasomoteurs sino-carotidiens se rétablissent, en effet, à leur valeur normale, quelques minutes après l'injection de 1 mg/kg 757 L.

La dépression de la conduction au niveau des synapses vagues est, par contre, persistante.

On injecte ensuite une nouvelle dose de 2 mg/kg 757 L. La pression artérielle tombe de 120 à 90-100 mm. Hg.

L'excitation du nerf vague cardiaque ($\uparrow 1$ - $\uparrow 2$, fig. 2) ne provoque plus qu'une faible bradycardie, et les réflexes vasomoteurs déterminés par l'occlusion ($\uparrow 3$, fig. 2) et la désocclusion des carotides communes ($\uparrow 4$, fig. 2), ainsi que par l'excitation du bout central du nerf vague ($\uparrow 5$ - $\uparrow 6$, fig. 2) sont faibles.

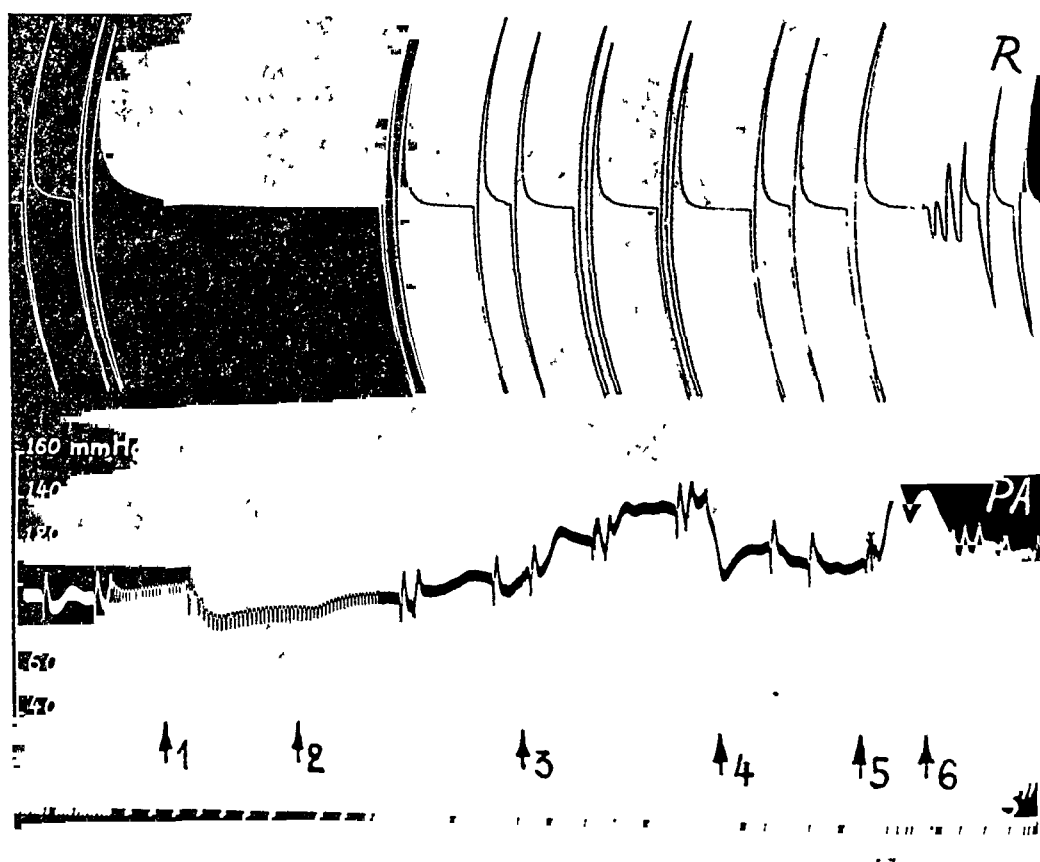


FIG. 2

Même chien qu'en fig. 1.

Respiration spontanée.

$\uparrow 1$ — $\uparrow 2$: excitation du nerf vague cardiaque, après injection i. v. d'une dose totale de 3 mg/kg 757 L.

$\uparrow 3$ — $\uparrow 4$: occlusion et désocclusion des carotides communes.

$\uparrow 5$ — $\uparrow 6$: excitation du bout central du nerf vague.

La conduction au niveau des synapses vagues et vasomoteurs est pratiquement bloquée (fig. 3, $\uparrow 1$ - $\uparrow 2$; $\uparrow 3$ - $\uparrow 4$; $\uparrow 5$ - $\uparrow 6$) après l'injection d'une dose totale de 9 mg/kg 757 L.

Une nouvelle injection ($\uparrow 7$, fig. 3) de 1 mg/kg, soit au total 10 mg/kg 757 L, provoque une chute de la pression artérielle et un arrêt de la respiration.

L'animal, est, à ce moment, curarisé totalement.

L'injection intraveineuse de 10 mg de tartrate de nicotine ne détermine ni bradycardie, ni hypertension artérielle. Les synapses parasymphatiques et sympathiques sont donc complètement paralysés par cette dose de 757 L.

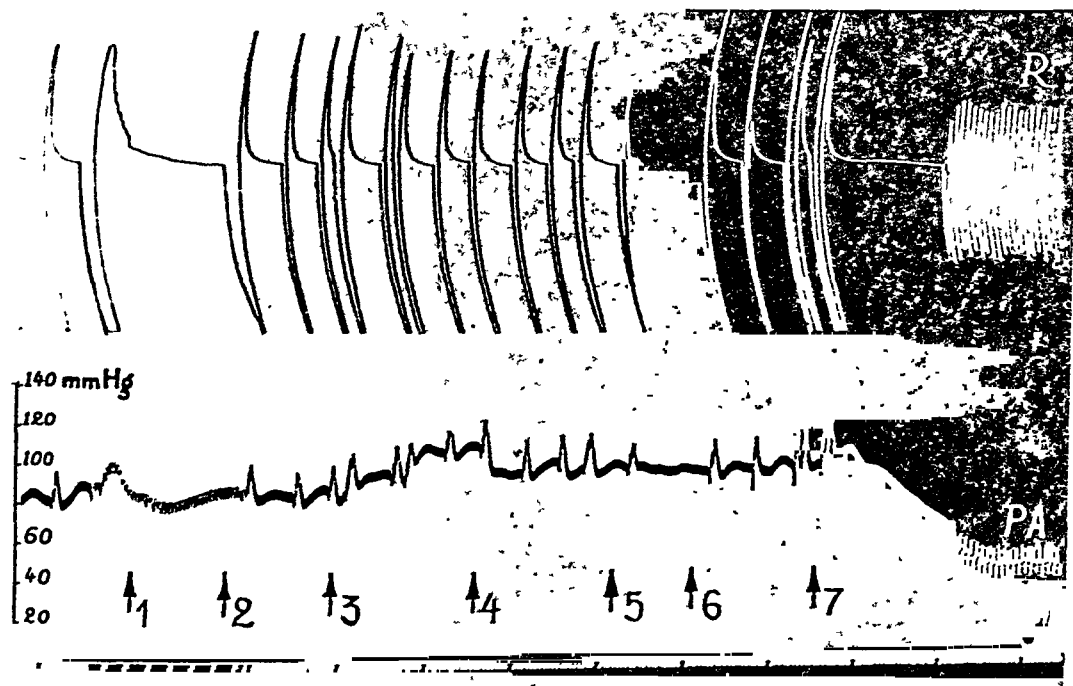


FIG. 3

Même chien qu'en fig. 1 et 2.

$\uparrow 1$ — $\uparrow 2$: excitation du nerf vague cardiaque, après injection i.v. d'une dose totale de 9 mg/kg 757 L.

$\uparrow 3$ — $\uparrow 4$: occlusion et désocclusion des carotides communes.

$\uparrow 5$ — $\uparrow 6$: excitation du bout central du nerf vague.

$\uparrow 7$: injection i.v. de 1 mg/kg 757 L, soit une dose totale de 10 mg/kg 757 L. Respiration artificielle, l'animal étant totalement curarisé.

Ces faits expérimentaux montrent que le 757 L déprime, puis paralyse les synapses végétatifs périphériques. La dose synaptolytique de 757 L est également curarisante.

2) Lauryl-diméthylamino-dioxy-propane (765 L).

Ce composé, synthétisé par LE BIHAN et coll. (1), n'a pas encore fait l'objet de recherches expérimentales.

Voici le protocole d'une expérience :

Chien, 7 kg., anesthésié à la morphine-chloralosane. Les nerfs vagues cervicaux sont sectionnés. On enregistre la pression artérielle, la fréquence cardiaque et la respiration.

L'hypotension au niveau des sinus carotidiens ($\uparrow 1 - \uparrow 2$, fig. 4) détermine une hypertension artérielle réflexe très marquée.

L'excitation du nerf vague cardiaque provoque un arrêt du cœur ($\uparrow 3$, fig. 4).

L'injection intraveineuse, ($\uparrow 1$, fig. 5), de 1 mg/kg 765 L provoque une légère chute de la pression artérielle et une inhibition respiratoire passagère.

Une nouvelle dose de 1 mg/kg de 765 L est injectée.

Après cette dose totale de 2 mg/kg 765 L, l'excitation du nerf vague cardiaque ($\uparrow 2$, $\uparrow 3$, fig. 5) et l'hypotension au niveau des sinus carotidiens ($\uparrow 4 - \uparrow 5$, fig. 5) déterminent une cardio-inhibition et une hypertension réflexe plus faibles qu'avant l'injection de 765 L.

Une nouvelle injection ($\uparrow 6$, fig. 5) de 2 mg/kg 765 L, la dose totale étant ainsi de 4 mg/kg, entraîne une chute plus profonde de la pression artérielle et une forte inhibition respiratoire. L'animal est curarisé, en ce qui concerne ses muscles squelettiques et intercostaux. Seul le diaphragme présente encore quelques mouvements respiratoires superficiels. La respiration artificielle doit être effectuée. La bradycardie par l'excitation du nerf vague cardiaque et les réflexes vasomoteurs d'origine sino-carotidienne sont très déprimés.

Des injections successives de 765 L, usqu'à la dose totale de 8 mg/kg, provoquent une curarisation complète. Les réflexes vasomoteurs sino-carotidiens ($\uparrow 1 - \uparrow 2$, fig. 6) sont très déprimés, mais non supprimés.

La bradycardie par excitation du nerf vague cardiaque ($\uparrow 3 - \uparrow 4$, fig. 6) et la bradycardie nicotinique font défaut.

Le 765 L est donc un curarisant; il paralyse également les synapses parasympathiques et déprime notablement les synapses sympathiques.

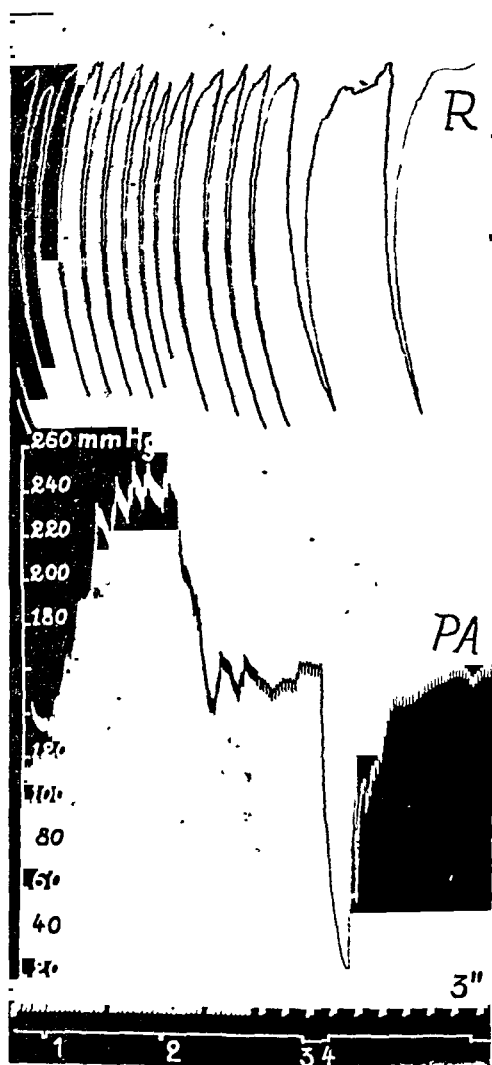


FIG. 4

Chien, 7 kg. Anesthésié à la morphine-chloralosane. Nerfs vagues sectionnés.

De haut en bas: Respiration (R), Pression artérielle (P.A.). Temps: 3 sec.

$\uparrow 1 - \uparrow 2$: occlusion et désocclusion des carotides communes.

$\uparrow 3 - \uparrow 4$: excitation du nerf vague cardiaque.

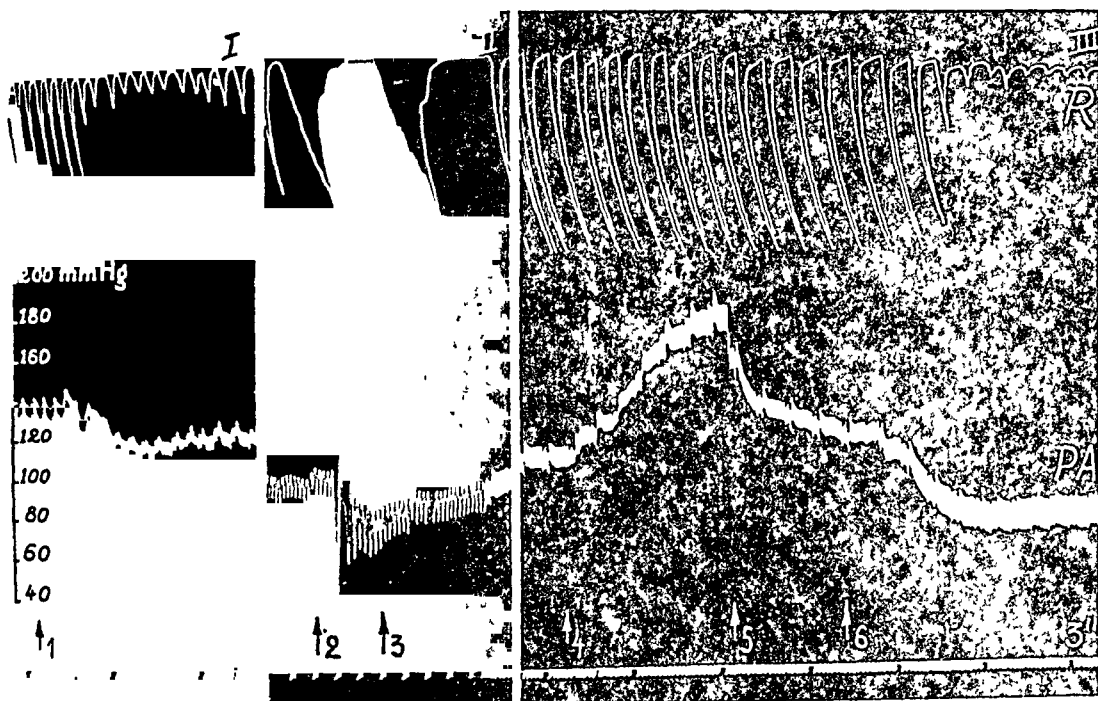


FIG. 5

Même chien qu'en fig. 4.

↑ 1 : injection i.v. de 1 mg/kg 765 L.

Entre I et II : injection i.v. de 1 mg/kg 765 L.

↑ 2 — ↑ 3 : excitation du nerf vague cardiaque.

↑ 4 — ↑ 5 : occlusion et désocclusion des carotides communes.

↑ 6 : injection i.v. de 2 mg/kg 765 L. Soit au total 4 mg/kg 765 L.

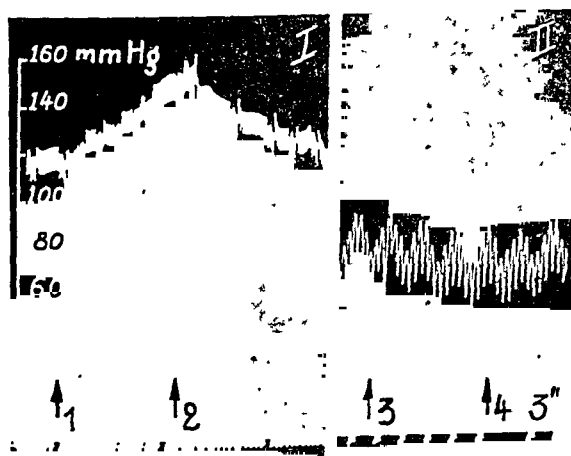


FIG. 6

Même chien que fig. 4 et 5.

Respiration artificielle; l'animal étant curarisé par l'injection i.v. de 4 mg/kg 765 L

↑ 1 — ↑ 2 : occlusion et désocclusion des carotides communes.

↑ 3 — ↑ 4 : excitation du nerf vague cardiaque.

CONCLUSIONS

Le lauryl-diméthylamino-acétoxy-éthane (757 L) et le lauryl-diméthylamino-dioxy-propane (765 L) sont des composés synaptolytiques, curarisants et nicotinolytiques. Les doses synaptolytiques sont voisines des doses curarisantes.

SUMMARY

Lauryl-dimethylamino-acetoxy-ethane (757 L) and lauryl-dimethylamino-dioxy-propane (765 L) are synaptolytic, curarizing and nicotinolytic agents. The synaptolytic doses nearly correspond to the curarizing doses of these compounds.

BIBLIOGRAPHIE

1. — LE Bihan H., RAYET P. et URBAIN, M. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1949, 79, 481.
2. — DALLEMACNE, M. J. et PHILIPOT, E. *Ibid.*, 1949, 79, 413.
3. — VAN DEN HEUVEL, G. *Ibid.*, 1949, 79, 432.

TABLE DES AUTEURS ET DES MATIÈRES

(en français)

A

ABOOD, L. G., voir KUN, E.	51
Acétylcholine —, Actions pharmacologiques du parpanit, de l'atropine, du tétra-éthylammonium sur les propriétés vasomotrices de l'—	35
Acétylcholine —, Actions du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène vasopressive des chémorécepteurs du glomus carotidien à l'—	79
Acétylcholine —, Actions du Nu-683 sur l'excitabilité du nerf vague cardiaque et sur la sensibilité du cœur à l'—	89
Acétylcho'ne —, L'antagonisme curare - —	159
Acétylcholine —, Influences du tétra-éthyl-ammonium sur l'action myotique de l'—	347
Acétylsalicylamides —, Action stimulante respiratoire des —	451
Acide phényl-éthyl-barbiturique — — — —, Sur l'action de l'— — — — (luminal) sur le cœur de grenouille perfusé	15
Actedron —, L'action de l'— sur la température du corps	1
Activité antimétabolique — —, Hypothèse au sujet de l'— — du gammahexane sur l'inositol	28
Activité laxative — —, Études au sujet de l'— — des dérivés du triphénylméthane	246
Adrénaline —, Action de l'— associée à l'endocorticaline sur le cœur isolé de grenouille	209
Aérosols —, Études au sujet des —	388
Aérosols —, Études au sujet des —	413
ALFORD, W. C., voir DAUTREBANDE, L.	388
Alpha-naphtyle-thiourée — — — —, Au sujet de la toxicité de l'— — — —	301
Aluminium —, Action de la poudre d'— en aérosol sur le dépôt pulmonaire de la poussière de silice	388
Amino-4'-diéthylaminopropylamino-diphénylesulfone	420
Anastomoses —, Au sujet d'— artério-veineuses dans la circulation pulmonaire	99
Antagonisme —, L'— curare-acétylcholine et la notion de pA_x	159
Antagonisme ionique — —, Contribution à l'étude de l'— — en chimiothérapie	44
Anticholinestérase —, Pouvoir anticholinestérasique de la caféine, de la théophylline et de la théobromine	361
Antifibrillants —, Action antifibrillante cardiaque de nouveaux composés	352
Antihistaminiques —, Agents — qui dérivent du diphénylméthane	119
Antihistaminiques —, Les effets des — sur la pression du liquide cébrospinal	310
Antihistaminique —, Études pharmacologiques d'un nouveau composé — le chlorure de N-(p-chlorobenzhydryl)-N'-Méthyl piperazine	378
Atropine —, Actions pharmacologiques de l'— sur les propriétés vasomotrices de l'acétylcholine	35

B

Bis-aminophénoxy-alkanes — — — —, Recherches sur les poisons curarisants : — — —	137
Bisquinoloxo-alkanes — — — —, Recherches sur les poisons curarisants de synthèse : — — —	137

BONELLI, M. et SALA, G., Influenza del paratormone e della vitamina D ₂ sull'attività fosfatasica del rene di ratto	457
BOSMA, J. F. voir DICK, C. F.	189
BOUCKAERT, J. H., voir PEETERS, G.	355
BOUNAMEAUX, J. et GOFFART, M., Pouvoir anticholinestérasique de la caféine, de la théophylline et de la théobromine	361
BOVET, D., COURVOISIER, S., DUCROT, R. et HORCLOIS, R., Recherches sur les poisons curarisants de synthèse : 1 ^{re} Partie, Bisquinoloxo-alkanes et Bis-amino-phénoxy-alkanes	137
BOVET, D., voir GUARINO, S.	159
BOVET, D., DEPIERRE, FR., COURVOISIER, S. et DE LESTRANGE, S., Recherches sur les poisons curarisants de synthèse : II ^{me} partie, Éthers phénoliques à fonction ammonium quaternaire. Action du tri-iodoéthylate de tri(diéthylaminoéthoxy) benzène (2559 F.)	172
BOVET, D., voir JACOB, J.	420
BRÂNISTEANU, D. et POPOVICI, GH. GH., Sur l'action de l'acide phényl-éthyl-barbiturique (luminal) sur le cœur de grenouille perfusé (in situ et isolé)	15
BRÂNISTEANU, D. et POPOVICI, GH. GH., Action de l'association sulfathiazol-luminal sur le cœur de grenouille	95
BRION, A., Sur la toxicité de l'alpha-naphtyle-thiourée	301
Bronches —, Actions pharmacologiques sur les — du cobaye	359

C

Caféine —, Pouvoir anticholinestérasique de la —	361
CALDEYRO, R. et GARCIA AUSTT, E., Sur la pharmacologie du diméthylcarbamate d'hydroxy-phényl-benzyl-triméthylammonium (Nu-683) : V. Actions du Nu-683 sur l'excitabilité du nerf vague cardiaque et sur la sensibilité du cœur à l'acétylcholine	89
CAMERON, A., voir CRAVER, B. N.	310
Camphosulfonate de quinine — — —, Action du — — — sur le travail cardiaque chez la grenouille	125
Cardiotoxique —, Propriétés — du 2489 F, action antagoniste du Dacorène	420
CASANOVAS, M., voir VALDECASAS, F. G.	28
Cathions —, Paludrine et échange de —	470
Centres nerveux — —, Le mécanisme d'hypertension artérielle après injection de potassium dans les — —	199
Chémo-récepteurs — —, Actions du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène vasopressive des — —	79
Chémo-récepteurs — —, Action du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène respiratoire des — — du glomus carotidien	82
Chimiothérapie —, Contribution à l'étude de l'antagonisme ionique en —	44
Chlorhydrate de diéthylaminoéthyl- <i>n</i> -thiodiphénylamine — — — — —, Action du — — — — — sur le métabolisme basal et le métabolisme après effort de sujets hyperthyroïdiens et normothyroïdiens	464
Chlorure de N-(<i>p</i> -chlorobenzhydryl)- N'-méthyl-piperazine — — — — —, Études pharmacologiques d'un nouveau composé antihistaminique, le — — — — —	378
Chlorure de Sodium — — —, Action du — — — en aérosol sur le dépôt pulmonaire de la poussière de silice	388
Chlorure de sodium — — —, Aggrégation de poussière avec des aérosols de — — —	413
Cholinestérase —, Pouvoir anticholinestérasique de la caféine, théophylline et théobromine	361

CICARDO, V. H., The mechanism of arterial hypertension after potassium injections into the nerve centers	199
Cœur —, Sur l'action du luminal sur le — de grenouille perfusé	15
Cœur —, Les courants d'action des nerfs sensibles cardiaques lors de l'insuffisance cardiaque expérimentale	69
Cœur —, Action du Nu-683 sur l'excitabilité du nerf vague cardiaque et sur la sensibilité du — à l'acétylcholine	89
Cœur, Action de l'association sulfathiazol-luminal sur le — de grenouille	95
Cœur —, Action du camphosulfonate de quinine sur le travail cardiaque chez la grenouille	125
Cœur isolé — —, Action de l'adrénaline associée à l'endocorticaline sur le cœur isolé de grenouille	209
Cœur —, Action antifibrillante cardiaque de nouveaux composés	352
Cœur —, Propriétés cardiotoniques du 2489 F	420
Contraction —, — et suppression	189
Convulsions —, Proprioception et —	110
Courants d'action — —, Les — — des nerfs sensibles du cœur lors de l'insuffisance cardiaque expérimentale	69
COURVOISIER, S., voir BOVET, D.	137
COURVOISIER, S., voir BOVET, D.	172
COUSSENS, R., voir PEETERS, G.	355
CRAVER, B. N., CAMERON, A. and SMITH, J., Kymographic registration of cerebrospinal fluid pressure (in dogs and cats) : Effects of antihistaminics and common drugs thereon	310
Curare —, Recherches sur les poisons curarisants de synthèse	137
Curare —, L'antagonisme — - acétylcholine et la notion de pA_x	159
Curare —, Recherches sur les poisons curarisants de synthèse	172

D

Dacorène —, Propriétés cardiotoxiques du 2489 F, action antagoniste du 1262 F	420
DALLEMAGNE, M. J., voir PHILIPPOT, E.	451
DAUTREBANDE, L., ALFORD, W. C., IRWIN, D. A., MITCHELL, E. R., THOMPSON, E. C., WEAVER, F. L. et WOOD, E. J., Studies on aerosols; Effect of aluminum powder and of NaCl aerosols upon the pulmonary deposition of silica dust	388
DAUTREBANDE, L., KAHLER, H., LLOYD, B. J. et MITCHELL, E. R.	413
DE LESTRANGE, S., voir BOVET, D.	172
DEPIERRE, FR., voir BOVET, D.	172
Dermatologie —, Action du gammahexane sur les levures d'intérêt dermatologique	28
DE SCHAEPPDRYVER, A., Actions pharmacologiques sur les bronches du cobaye	359
DE VLEESCHHOUWER, G. R. et VERBEKE, R., Pharmacological effects of the diethyl-aminoethyl ester of phenylcyclopentane carboxylic acid (parpanit), atropine and tetraethylammonium on the vasomotor properties of acetylcholine	35
DICK, C. F., BOSMA, J. F. et GELLHORN, E., Contracture and suppression	189
Digitaliques —, Recherches sur le mécanisme d'action des —	336
Di-isopropylfluorophosphonate — —, Influences du tétra-éthyl-ammonium sur l'action myotique du —	347
Diméthylcarbamate d'hydroxy-phényl-benzyl-triméthylammonium — — — — —	
—, Sur la pharmacologie du — — — — — (Nu-683)	79
Diméthylcarbamate d'hydroxy-phényl-benzyl-triméthylammonium — — — — —, Sur la pharmacologie du — — — — — (Nu-683)	82
Diméthylcarbamate d'hydroxy-phényl-benzyl-triméthylammonium — — — — —, Sur la pharmacologie du — — — — — (Nu-683)	85

Diméthylcarbamate d'hydroxy-phényl-benzyl-triméthylammonium — — — — —,	
Sur la pharmacologie du — — — — — (Nu-683)	89
DINWIDDIE, W. G., voir MILLS, J.	119
Diphénylméthane —, Agents antihistaminiques qui dérivent du —	119
Diurèse —, L'influence de la traite sur la diurèse de la vache gravide	355
DUCROT, R., voir BOVET, D.	137

E

EICHHOLTZ, F., HOTOVY, R. u. ERDNISS, H., Eine einfache Methode der Myographie und deren Anwendung	62
Endocorticaline —, Action de l'adrénaline associée à l'— sur le cœur isolé de grenouille	209
Enregistrement au Kymographe — — — — — de la pression du liquide cérebrospinal	310
ERDNISS, H., voir EICHHOLTZ, F.	62
ERÖZ, K. and TERZIOĞLU, M., The effect of glucose injections on the blood sugar level, alkali reserve, and blood- and urine pH values of starved rabbits	255
ERÖZ, K., voir TERZIOĞLU, M.	269
Ésérine —, Influences du tétra-éthyl-ammonium sur l'action myotique de l'—	347
Ester diéthylaminoéthylque de l'acide phényl-cyclopentane-carboxylique — — — — —, Actions pharmacologiques de l'— — — — — sur les propriétés vasomotrices de l'acétylcholine	35
Éthers phénoliques — —, Recherches sur les poisons curarisants de synthèse : — — à fonction ammonium quaternaire	172

F

FERNANDEZ, A., Sur la pharmacologie du diméthylcarbamate d'hydroxy-phényl-benzyl-triméthylammonium (Nu-683) : III, Action du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène respiratoire des chémo-récepteurs du glomus carotidien	82
FERNANDEZ, A., et VINOLES, J. J., Sur la pharmacologie du diméthylcarbamate d'hydroxy-phényl-benzyl-triméthylammonium (Nu-683) : IV, Influences du Nu-683 sur la sécrétion salivaire	85
Fibrillations —, Action antifibrillante cardiaque de nouveaux composés	352
Fibrinolyse —, Activation de la — par la phospholipode	444
Foie —, Action de la morphine, de l'uréthane et du phénobarbital sur la synthèse du glycogène au dépens du glucose dans le foie de rat	51

G

Gammahexane —, Action du — sur les levures d'intérêt dermatologique	28
GARCIA AUSTT, E., voir CALDEYRO, R.,	89
GAY, J., voir GELLHORN, E.,	110
GELLHORN, G., HYDE, J. and GAY J., Proprioception and convulsions	110
GELLHORN, E., voir DICK, C. F.,	189
Glomus carotidien — —, Actions du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène vasopressive des chémo-récepteurs du — —,	79
Glomus carotidien — —, Action du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène respiratoire des chémo-récepteurs du — —,	82
Glucose —, Action de la morphine, de l'uréthane, du phénobarbital sur la synthèse du glycogène au dépens du — dans le foie de rat	51

Glucose —, Action des injections de — sur la teneur en — sanguin, la réserve alcaline, et le pH du sang et de l'urine de lapins à jeun	255
Glucose —, L'action de l'injection de glucose sur la régénération du sang chez le lapin	276
Glycogène —, Action de la morphine, de l'uréthane, du phénobarbital sur la synthèse du — au dépens du glucose dans le foie de rat	51
GOFFART, M., voir BOUNAMEAUX, J.,	361
GUARINO, S. et BOVET, D., L'antagonisme curare-acétylcholine et la notion de pAx,	159

H

HALSE, TH., Aktivierung der Fibrinolyse durch Phospholipide in Vitro und in Vivo	444
Hémostase —, Substances thioloprives et — spontanée	331
HEYMANS, C., et HOORENS, A., Influences du tétra-éthyl-ammonium sur l'action myotique des di-isopropylfluorophosphonate, acétylcholine, éserine et pilocarpine	347
Histamine —, Agents antihistaminiques qui dérivent du diphénylméthane	119
Histamine — Les effets des antihistaminiques sur la pression du liquide cérébro-spinal	310
Histamine —, Études pharmacologiques d'un nouveau composé antihistaminique	378
HOORENS, A., voir HEYMANS, C.,	347
HORCLOIS, R., voir BOVET, D.,	137
HOTOVY, R., voir EICHHOLTZ, F.,	62
HUGUES, J., et VAN CAUWENBERG, H., Substances thioloprives et hémostase spontanée	331
HÜRLIMANN, A., Ueber Kurz und Nebenschlüsse des Lungenkreislaufes	99
HYDE, J., voir GELLHORN, E.,	110
Hypertension —, Le mécanisme d' — artérielle après injection de potassium dans les centres nerveux	199
Hyperthyroïdiens —, Action du chlorhydrate de diéthylaminoéthyl- <i>n</i> -thiodiphénylamine sur le métabolisme après effort de sujets	464

I

Inositol —, Hypothèse au sujet de l'activité antimétabolique du gammahexane sur l'—	28
Insuffisance cardiaque — —, Les courants d'action des nerfs sensibles cardiaques lors de l' — — expérimentale	69
Ions —, Contributions à l'étude de l'antagonisme ionique en chimiothérapie	44
IRWIN, D. A., voir DAUTREBANDE, L.,	388

J

JACOB, J., MONTÉZIN, G., et BOVET, D., Propriétés cardio-toxiques du 2489 F (4-amino-4'-diéthylaminopropylamino-diphénylesulfone, action antagoniste du 1262 F (Dacorène)	420
---	-----

K

KAHLER, H., voir DAUTREBANDE, L.,	413
KAINDL, F., POLZER, K., und WERNER, G., Die Aktionsströme der sensiblen Herznerven bei experimenteller Herzinsuffizienz	69
KOWALEWSKI, K., voir MAHAUX, J.,	464
KUN, E., and ABOOD, L. G., « In vivo » action of morphine, urethane and phenobarbital on the glycogen synthesis from glucose in the rat liver	51

L

Lauryl-diméthylamino dioxy-propane — — —, Sur la pharmacologie du — — — (765 L)	474
Lauryl-diméthylamino-acétoxy-éthane — — — — —, Sur la pharmacologie du — — — (757L)	474
Laxatif —, Études au sujet de l'activité laxative des dérivés du triphénylméthane	236
Laxatif —, Études au sujet de l'activité laxative du triphénylméthane.	246
LEE, H. M., voir MILLS, J.,	119
Levures —, Action du gammahexane sur les — d'intérêt dermatologique	28
Liquide cérébrospinal — —, Enregistrement au Kymographe de la pression du — —	310
LLOYD, B. J., voir DAUTREBANDE, L.,	413
LOBATO GUIMARÃES, J., Action du camphosulfonate de quinine sur le travail cardiaque chez la grenouille	125
LOEWE, I. A., voir LOEWE, S.,	236
LOEWE, S., and LOEWE I. A., Studies on the laxative activity of triphenylmethane derivatives II : Physicochemical aspects of the potency difference between « yellow phenolphthalein » and U. S. P. phenolphthalein	236
LOEWE, I. A., voir LOEWE, S.,	246
LOEWE, S., and LOEWE, I. A., Studies on the laxative activity of triphenylmethane derivatives. III : Physical characteristics of phenolphthalein in relation to « yellow phenolphthalein » activation	246
Luminal —, Sur l'action du — sur le cœur de grenouille perfusé	15
Luminal —, Action de l'association sulfathiazol — sur le cœur de grenouille	95

M

MAHAUX, J., et KOWALEWSKI, K., Action du chlorhydrate de diéthylamino-éthyl- <i>n</i> -thiodiphénylamine sur le métabolisme basal et le métabolisme après effort de sujets hyperthyroïdiens et normothyroïdiens	464
MASSART, L., Contribution à l'étude de l'antagonisme ionique en chimiothérapie	44
MASSART, L., Paludrine and cation exchange	470
MAZZELLA, H., et MIGLIARO, E., Sur la pharmacologie du diméthylcarbamate d'hydroxy-phényl-benzyl-triméthylammonium (Nu-683) II : Actions du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène vasopressive des chémorécepteurs du glomus carotidien à l'acétylcholine	79
Métabolisme —, Hypothèse au sujet de l'activité antimétabolique du gammahexane sur l'inositol	28
Métabolisme —, Recherches sur le mécanisme d'action des digitaliques : Effets métaboliques de l'ouabaine	336
Métabolisme —, Action du chlorhydrate de diéthylaminoéthyl- <i>n</i> -thiodiphénylamine sur le — après effort de sujets hyperthyroïdiens et normothyroïdiens	464

Métabolisme basal — —, Action du chlorhydrate de diéthylaminoéthyl- <i>n</i> -thio-diphénylamine sur le — —	464
MIGLIARO, E., voir MAZZELLA, H.,	79
MILLS, J., ROHRMANN, E. DINWIDDIE, W. G., and LEE, H. M., Antihistaminic agents derived from diphenylmethane	119
MITCHELL, E. R., voir DAUTREBANDE, L.,	388
MONTÉZIN, G., voir JACOB, J.,	420
Morphine —, Action de la — « in vivo » sur la synthèse du glycogène au dépens du glucose dans le foie de rat	51
Myographie —, Une méthode simple de la — et son application	12
Myotique —, Influences du tétra-éthyl-ammonium sur l'action — des di-isopropyl-fluorophosphate, acétylcholine, éserine et pilocarpine	347

N

Nerfs —, Les courants d'action des — sensibles cardiaques lors de l'insuffisance cardiaque expérimentale	69
Nerfs —, Le mécanisme d'hypertension artérielle après injection de potassium dans les centres nerveux	199
Nerf vague — —, Actions du Nu-683 sur l'excitabilité du — — cardiaque et sur la sensibilité du cœur à l'acétylcholine	89
Normothyroïdiens —, Action du chlorhydrate de diéthylaminoéthyl- <i>n</i> -thiodiphénylamine sur le métabolisme basal et le métabolisme après effort de sujets —	464
Nu-683 — —, Sur la pharmacologie du diméthylcarbamate d'hydroxy-phénylbenzyl-triméthylammonium (— —)	79
Nu-683 — —, Actions du — — sur la sensibilité réflexogène vasopressive des chémorécepteurs du glomus carotidien à l'acétylcholine	79
Nu-683 — —, Action du — — sur la sensibilité réflexogène respiratoire des chémorécepteurs du glomus carotidien	82
Nu-683 — —, Influences du — — sur la sécrétion salivaire	85
Nu-683 — —, Sur la pharmacologie du diméthylcarbamate d'hydroxy-phénylbenzyl-triméthylammonium — —	85
Nu-683 — —, Sur la pharmacologie du diméthylcarbamate d'hydroxy-phénylbenzyl-triméthylammonium — —	89
Nu-683 — —, Actions du — — sur l'excitabilité du nerf vague cardiaque et sur la sensibilité du cœur à l'acétylcholine	89

O

Ouabaïne —, Effets métaboliques de l'—	336
OYAERT, W., voir PEETERS, G.,	355

P

Paludrine —, — et échange de cations	470
Parathormone —, Influence de la — sur l'activité de la phosphatase du rein de rat	457
Parpanit —, Actions pharmacologiques du — sur les propriétés vasomotrices de l'acétylcholine	35
pAx —, L'antagonisme curare acétylcholine et la notion de —	159
PEETERS, G., COUSSENS, R., BOUCKAERT, J. H. et OYAERT, W., L'Influence de la traite sur la diurèse de la vache gravide	355
pH —, Action des injections de glucose sur le — du sang et de l'urine de lapins à jeun	255

Phénobarbital —, Action du — sur la synthèse du glycogène au dépens du glucose dans le foie de rat	51
Phénolphthaléine —, Aspects physico-chimiques de la différence d'activité entre la — U. S. P. et la phénolphthaléine jaune	236
Phénolphthaléine jaune —, Aspects physico-chimiques de la différence d'activité entre la — — et la phénolphthaléine U. S. P.	236
Phénolphthaléine jaune —, Les caractéristiques physiques de la phénolphthaléine en rapport avec l'activation de la — —	246
Phénylisopropylamine —, L'action de l'actedron (—) sur la température du corps	1
PHILIPPOT, E. et DALLEMAGNE, M. J., Action stimulante respiratoire des acétylsalicylamides	451
Phosphatase —, Influence de la parathormone et de la vitamine D ₂ sur l'activité de la — du rein de rat	457
Phospholipoïde —, Activation de la fibrinolyse par la phospholipoïde	444
Pilocarpine —, Influences du tétra-éthyl-ammonium sur l'action myotique de la —	347
Poisons curarissants — —, Recherches sur les — — de synthèse: 1 ^{re} Partie, Bis-quinoloxo-alkanes et Bis-aminophénoxy-alkanes	137
Poisons curarissants — —, Recherches sur les — — de synthèse	172
POLZER, K., voir KAINDL, F.	69
POPOVICI, GH. GH., voir BRĂNISTEANU, D.	15
POPOVICI, GH. GH., voir BRĂNISTEANU, D.	95
Potassium —, Le mécanisme d'hypertension artérielle après injection de — dans les centres nerveux	199
Poumon —, Au sujet d'anastomoses artério-veineuses dans la circulation pulmonaire	99
Poumon —, Action de la poudre d'aluminium et du NaCl en aérosols sur le dépôt pulmonaire de la poussière de silice	388
Poussière —, Aggrégation de — avec des aérosols de NaCl	413
Propriétés vasomotrices — —, Actions pharmacologiques du parpanit, de l'atropine et du tétraéthylammonium sur les — — de l'acétylcholine	35
PUIG MUSET, P., voir VALDECASAS, F. G.	28

Q

Quinine —, Action du camphosulfonate de — sur le travail cardiaque chez la grenouille	125
---	-----

R

RABBENO, A., Correlazioni fra interrenale e cromaffine: Nota I. Azione associata contemporanea dell'adrenalina e dell'endocorticalina sul cuore isolato di rana	209
RAŠKOVA, H. and VOTAVA, Z., A pharmacological analysis of the o-tolyether of glycerol	320
Réflexes —, Actions du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène vasopressive des chémorécepteurs du glomus carotidien à l'acétylcholine	79
Réflexes —, Action du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène respiratoire des chémorécepteurs du glomus carotidien	82
Régénération du sang — —, L'action de l'injection de glucose sur la — — chez le lapin	276
Rein —, Influence de la parathormone et de la vitamine D ₂ sur l'activité de la phosphatase du — de rat	457
Réserve alcaline — —, Action des injections de glucose sur la — — de lapins à jeun	255
Respiration —, Action du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène respiratoire des chémorécepteurs du glomus carotidien	82

Respiration —, Action stimulante respiratoire des acétylsalicylamides	451
RICHARDS, R. K., voir ROTH, L. W.	378
ROHRMANN, E., voir MILLS, J.	119
ROOBROECK, G., Action antifibrillante cardiaque de nouveau composés	352
ROTH, L. W., RICHARDS, R. K. et SHEPPERD, I. M., Pharmacologic studies of a new antihistamine compound (N-(p-chlorobenzhydryl)-N'-(Méthyl piperazine hydrochloride)	378

S

SALA, G., voir BONELLI, M.	457
Salive —, Influences du Nu-683 sur la sécrétion salivaire	85
Sang —, L'action de l'injection de glucose sur la régénération du — chez le lapin	276
Sécrétion salivaire — —, Influences du Nu-683 sur la — —	85
SEGRE, G., Ricerche sul meccanismo d'azione dei digitalici : II. Effetti metabolici della uabaina	336
Sensibilité réflexogène — —, Actions du Nu-683 sur la — — vasopressive des chémo-récepteurs du glomus carotidien à l'acétylcholine	79
Sensibilité réflexogène — —, Action du Nu-683 sur la — — respiratoire des chémo-récepteurs du glomus carotidien	82
SHEPPERD, I. M., voir ROTH, L. W.	378
Silice —, Action de la poudre d'aluminium et du NaCl en aérosols sur le dépôt pulmonaire de la poussière de —	388
SIMONYI, J. and SZENT GYÖRGYI, D., The effect of actedron (phenylisopropylamine) and thyroxine on the body temperature	1
SMITH, J., voir CRAVER, B. N.	310
Société Belge de Physiologie	351
Substances thiolooprives — —, — — et hémostasie spontanée	331
Sucrose —, Les effets des injections souscutanées de — chez le lapin	269
Sulfathiazol —, Action de l'association — luminal sur le cœur de grenouille	95
Suppression —, Contraction et —	189
Synthèse du glycogène — — —, Action de la morphine, de l'uréthane et du phénobarbital sur la — — — au dépens du glucose dans le foie de rat	51
SZENTGYÖRGYI, D., voir SIMONYI, J.	1

T

Température corporelle — —, L'action de l'actédrone (phénylisopropylamine) et la thyroxine sur la — —	1
T. E. P. P. —, Au sujet de la pharmacologie du tétraéthylpyrophosphate —	19
TERZIOĞLU, M., voir ERÖZ, K.	255
TERZIOĞLU, M. and ERÖZ, K., The fate of subcutaneously injected sucrose in the rabbit	269
TERZIOĞLU, M., The effect of glucose injections on the regeneration of blood in the rabbit	276
Tétraéthylammonium —, Actions pharmacologique du — sur les propriétés vasomotrices de l'acétylcholine	35
Tétra-éthyl-ammonium — — —, Influences du — — — sur l'action myotique des di-isopropylfluorophosphonate, acétylcholine, éserine et pilocarpine	347
Tétraéthylpyrophosphate —, Au sujet de la pharmacologie du —	19
Théobromine —, Pouvoir anticholinestérasique de la —	361
Théophylline —, Pouvoir anticholinestérasique de la —	361

THOMPSON, E. C., voir DAUTREBANDE, L.	388
Thyroxine —, L'action de la — sur la température du corps	1
o-Tolyléther du glycerol — — —, Une analyse pharmacologique du — — —	320
Traite —, L'influence de la — sur la diurèse de la vache gravide	355
Travail cardiaque — —, Action du camphosulfonate de quinine sur le — — chez le grenouille	125
Tri-iodoéthylate de tri(diéthylaminoéthoxy)benzène (2559 F) — — — — —, Recherches sur les poisons curarisants de synthèse. Action du — — — — —	172
Triphénylméthane —, Études au sujet de l'activité laxative des dérivés du —	236
Triphénylméthane —, Études au sujet de l'activité laxative des dérivés du —	246

U

Uréthane —, Action de l'— « in vivo » sur la synthèse du glycogène au dépens du glucose dans le foie de rat	51
---	----

V

VALDECASAS, F. G., VILANOVA, X., CASANOVAS, M. et PUIG MUSSET, P., Action du gammahexane sur les levures d'intérêt dermatologique: Hypothèse au sujet de son activité antimétabolique sur l'inositol	28
VAN CAUWENBERG, H., voir HUGUES, J.	331
VAN DEN HEUVEL, G., Sur la pharmacologie du lauryl-diméthylamino-acétoxy-éthane (757 L) et du lauryl-diméthylamino-dioxy-propane (765 L)	474
Vasomoteur —, Actions pharmacologiques du parpanit, de l'atropine et du tétraéthylammonium sur les propriétés vasomotrices de l'acétylcholine	35
Vasopression —, Actions du Nu-683 sur la sensibilité réflexogène vasopressive des chémo-récepteurs du glomus carotidien à l'acétylcholine	79
VERBEKE, R., On the pharmacology of tetraethylpyrophosphate (T. E. P. P.)	19
VERBEKE, R., voir DE VLEESCHHOUWER, G. R.	35
VILANOVA, X., voir VALDECASAS, F. G.	28
VINOLES, J. J., voir FERNANDEZ, A.	85
Vitamine D ₂ — —, Influence de la — — sur l'activité de la phosphatase du rein de rat	457
VOTAVA, Z., voir RAŠKOVA, H.	320

W

WEAVER, F. L., voir DAUTREBANDE, L.	388
WERNER, G., voir KAINDL, F.	69
WOOD, E. J., voir DAUTREBANDE, L.	388

